

東京大学大学院 新領域創成科学研究科  
先端生命科学専攻 がん先端生命科学分野

平成 22 年度

修士論文

卵巣がんに対する  
pH 応答性 Epirubicin 内包 micelle 製剤の  
薬効及び毒性の評価

指導教員 松村 保広

96316 今野 まつみ

## 【目次】

要旨	3
略語	6
第1章 背景・目的	
1-1. 卵巣がんについて	8
1-1-1. 卵巣がんの罹患率と死亡率の推移	
1-1-2. 卵巣がんの病期と生存率	
1-1-3. 卵巣がんの病理学的分類	
1-1-4. 卵巣がん治療の現状と問題点	
1-2. Drug Delivery System (DDS)	12
1-2-1. DDS 製剤とは	
1-2-2. NC6300 の特徴	
1-2-3. NC6300 のメリット	
1-3. 研究目的	15
第2章 実験方法	
2-1. 細胞培養	17
2-1-1. 細胞株	
2-1-2. 細胞培養及び継代方法	
2-1-3. 細胞保存方法	
2-2. 薬剤	18
2-3. NC6300 の pH の異なる溶液中での Epirubicin の経時的リリース能の変化	19
2-3-1. Sample の作成方法	
2-3-2. High Performance Liquid Chromatography (HPLC) による測定	
2-4. 殺細胞効果測定	19
2-5. 抗腫瘍効果の検討	20
2-5-1. 卵巣がん皮下腫瘍マウスモデルの作製	
2-5-2. 皮下腫瘍マウスモデルを用いた治療実験	
2-6. 薬物動態学的検討	21
2-6-1. HPLC による薬物濃度の測定	
2-6-1-1. 検量線の作成	
2-6-1-2. sample の作成・採取方法	
2-6-1-3. 薬剤の濃度測定方法	

2-6-2. AUC (Area under the concentration time curve 濃度曲線下面積) の算出	
2-7. 心エコーによる非侵襲的心機能の測定	23
2-7-1. 薬剤投与条件と実験スケジュール	
2-7-2. 心エコーによる測定方法	
2-7-3. Ejection Fraction (EF: 左室駆出率) 及び Fractional Shortening (FS: 左室内 径短絡率) の数値測定方法	
2-8. 統計解析	25
第3章 実験結果	
3-1. NC6300 の pH の違いによる Epirubicin リリース能の変化	27
3-2. 培養細胞への殺細胞効果の検証	28
3-2-1. 各種卵巣がん細胞株に対する薬剤の殺細胞効果の検証	
3-2-2. 薬剤への暴露時間の違いによる殺細胞効果の変化	
3-3. 各臓器における薬物動態学的検討	30
3-3-1. 血漿中の薬剤濃度の時間的推移	
3-3-2. 組織中の薬剤濃度の時間的推移	
3-3-3. 血漿中及び組織中の薬物動態	
3-4. 皮下腫瘍マウスモデルを用いた治療実験	34
3-5. NC6300 の心機能への影響	35
第4章 考察・結論・今後の展望	
4-1. pH 応答性 micelle 製剤について	40
4-2. 抗がん作用について	41
4-3. 毒性について	43
4-4. 今後の展望	44
参考文献	45
謝辞	47

## 要旨

## 【背景・目的】

卵巣がんは、初期には自覚症状が乏しく、有効な検診法も確立していない為、早期発見が困難ながん種である。従って進行期がんで発見される割合が高く、外科的切除による根治が難しい。卵巣がんは化学療法が奏効する症例が多い腫瘍であり、根治が見込めない症例の多くは化学療法の対象となる。その場合、患者は一生抗がん剤と付き合っていくことになる。患者ができるだけつらい思いをせずに最期まで安心して治療が行えるよう、治療効果のみでなく副作用にも焦点を当てた薬剤の開発が必要であると考え。

NC6300 は Drug Delivery System (DDS) 製剤であり、pH 応答性 Epirubicin 内包 micelle 製剤である。本剤は治療効果と副作用の両面を考慮に入れた薬剤として有用ではないかと考えた。DDS とは薬物を選択的にがん組織内に到達させることで、副作用を抑えて効果的に薬効を発揮させようとする薬剤送達技術のことである。DDS の選択的腫瘍集積性のメカニズムとして Enhanced permeability and retention (EPR) 効果が挙げられる。これは、正常組織と腫瘍組織の脈管構造の違いに基づいて高分子物質が腫瘍特異的に漏出し、長時間蓄積する機序のことである (図 1.)。EPR 効果により NC6300 は、腫瘍組織に高濃度に集積し、かつ正常組織に分布する抗がん剤の濃度を減らすことができると考える。また NC6300 は pH 応答性 micelle という性質を有しており、細胞内リソソーム中の酸性 pH により抗がん剤と重合体の結合が切れて、抗腫瘍効果を発揮することが予想される。また血中の pH では分解しにくく、血中滞留時間の延長が期待できる。このような性質を持つ NC6300 を治療に用いるメリットとして、血中滞留性の向上、抗腫瘍効果の増強、副作用の軽減が挙げられる。以上の背景より、本研究では、新規製剤として DDS 製剤である NC6300 の卵巣がんに対する治療効果及び毒性の評価を行うこととした。

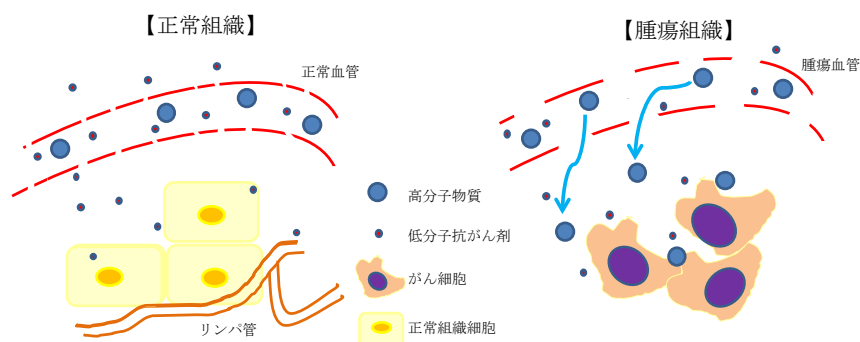


図 1. EPR 効果の概念図

低分子物質は、非選択的に血管から正常組織及び腫瘍組織に漏れ出す。一方高分子物質は、正常組織では血管構造が密で間隙が小さく組織へ漏出しにくい。漏出したとしてもリンパ管により回収される。一方固形腫瘍組織では、腫瘍血管構造が正常血管に比べて疎である為に著しい血管透過性の亢進が起こっている。また、血管の増生に見合ったリンパ回収系の増生が少ない。従って正常血管では血管外に漏出しにくい高分子物質であっても、腫瘍血管からは漏出しやすく、一旦腫瘍組織に漏出した高分子物質はその場に滞留しやすい。

## 【方法及び結果】

NC6300 及び Epirubicin を投与したマウス中の薬物動態学を HPLC にて測定した。その結果、EPR 効果にて NC6300 は Epirubicin に比べ有意に選択的腫瘍集積性が認められ、また心筋へは逆に NC6300 の集積が低かった。

NC6300 の抗がん作用を検討する為に、ES-2 皮下移植マウスモデルを用いて治療実験を行った。その結果、治療開始後 27 日目と 30 日目で同等量 (10 mg/kg) 投与した Epirubicin 群と NC6300 群を比較すると、NC6300 群の方が有意に抗腫瘍効果を示した (day27:P = 0.0235, day30 : P = 0.0192, NC6300 10 mg/kg vs Epirubicin 10 mg/kg, Student's *t*-test, 図 2.)。

また、NC6300 による心機能への影響を検討する為に、Epirubicin 投与群、NC6300 投与群、Doxorubicin 投与群、及び PBS 投与群の心毒性評価を心エコーにて行った。心エコーを用いて Ejection Fraction (%EF) を測定し、左心室収縮能を評価した (図 3.)。その結果、NC6300 群と Epirubicin 群を比較すると、NC6300 群は Epirubicin 群と比べて有意に EF 値の減少が小さく、心筋収縮能が保持されていた。

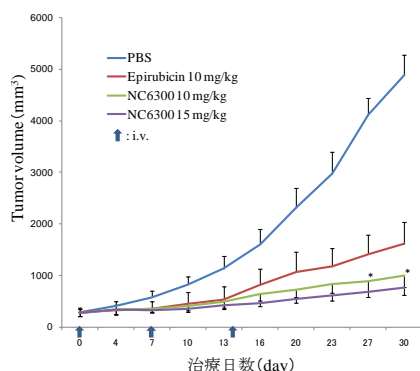


図 2. 腫瘍体積の変化

ES-2細胞株  $3 \times 10^6$  cells/100  $\mu$ l を皮下移植した皮下腫瘍マウスモデルに、NC6300 10 mg/kg/300 $\mu$ l, 15 mg/kg/300 $\mu$ l, Epirubicin 10 mg/kg/300 $\mu$ l, PBS 300 $\mu$ l を Day 0, 7, 14 で i.v. にて投与した。腫瘍体積は週2回測定した。  
\*:  $p < 0.05$  (mean  $\pm$  SD ; vs Epirubicin 10 mg/kg, Student's *t*-test)  
n=5

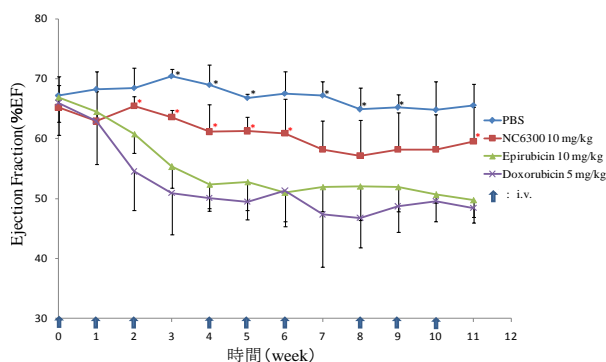


図 3. 左心室収縮能評価

5週齢C57BL マウスにEpirubicin 10 mg/kg, NC6300 10 mg/kg, Doxorubicin 5 mg/kg、及びPBSをi.v.にて投与し、心エコー測定を行った。乳頭筋レベルで切断したM-mode画像にて左室駆出率を測定した。週1回投与を3週連続で行い1週間の休薬期間を設けた。薬剤投与後11週まで測定を行い、計9回投与した。  
\*:  $p < 0.05$  (mean  $\pm$  SD ; vs NC6300, Student's *t*-test),  
\*:  $p < 0.05$  (mean  $\pm$  SD ; vs Epirubicin, Student's *t*-test), n=5

## 【考察・結論】

NC6300 は Epirubicin よりも抗腫瘍効果が優れており、かつ心毒性が軽減した。この結果から、NC6300 の臨床評価を行うべきであると考え。今後 pH 応答性のない Epirubicin 内包 micelle 製剤との抗腫瘍効果や副作用の程度の比較実験を行うことで、細胞内環境に反応する pH 応答性 micelle 製剤 NC6300 の有用性がより示せるのではないかと考える。

**【略語】**

DDS : Drug Delivery System

EPR : Enhanced Permeability and Retention

PEG : PolyEthylene Glycol

Top2 : Topoisomerase II

ATCC : American Type Culture Collection

DPBS: Dulbecco's Phosphate Buffered Saline

FBS: Fetal Bovine Serum

EDTA : EthyleneDiamine Teraacetic Acid

HPLC : High Performance Liquid Chromatography

cpm : count per minutes

i.v. : intravenous injection

AUC : Area Under the Concentration time curve

EF : Ejection Fraction

FS : Fractional Shortening

SV : Stroke Volume

LVEDV : Left Ventricular End-Diastolic Volume

LVESV : Left Ventricular End- Stroke Volume

IC<sub>50</sub> : 50% Inhibitory Concentration

## 第 1 章 背景・目的



## 1-1. 卵巣がんについて

### 1-1-1. 卵巣がんの罹患率と死亡率の推移

日本における卵巣がんは少子化・初産年齢の高齢化などの社会的背景により、粗罹患  
者数、死亡者数共に増加の一途をたどっている（図 1-1. [1]）。年齢とともに卵巣がんの罹  
患率は上昇し、とくに 40 歳を超えると急激に増加する。この傾向は欧米においても同様  
であり、卵巣がんの発生において加齢が重要な一因となっていることを示唆する。今後  
更なる高齢化や、卵巣がんのリスクファクターとなり得る未経産の増加 [2]や不妊治療で  
用いる排卵誘発剤の普及[3]により、卵巣がんの罹患率はますます増加傾向を辿るものと  
推測される。

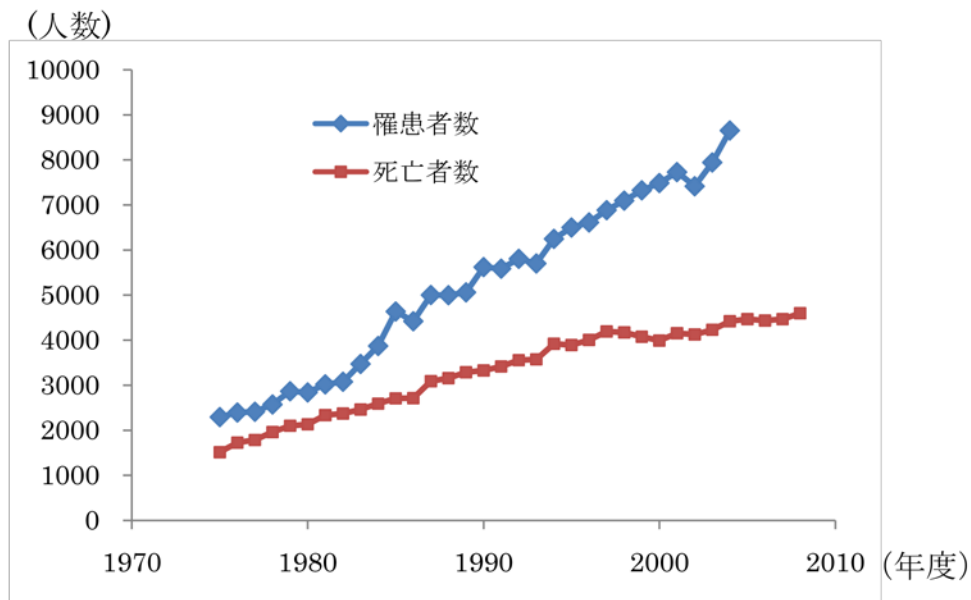
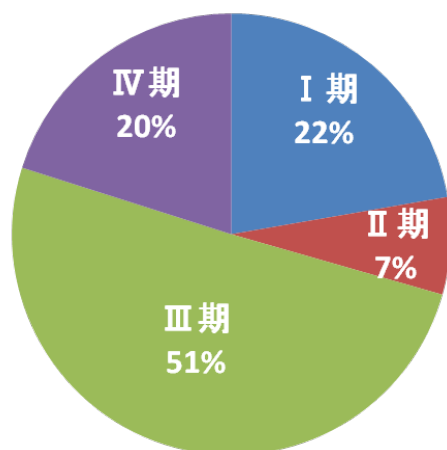


図 1-1. 卵巣がんの罹患率と死亡者数の推移[1]

### 1-1-2. 卵巣がんの病期と生存率

卵巣がんの初期には自覚症状が乏しく、また特異的腫瘍マーカーが少なく、現在有効な検診法も確立していない為、早期発見が非常に困難ながん腫である[4]。その為、進行がんで発見される割合が高く (図 1-2. [1])、かつ早期がんでもしばしば再発する為根治が難しい[5]。進行期に発見された場合の5年生存率はⅢ期で23.8%、Ⅳ期で11.6%であり、治療成績は良好ではない (表 1-1. [1])。このことより、生存率を上げ、進行卵巣がん患者のQOLをあげる為により効果の高い新規抗がん剤が求められている。

表 1-1. 卵巣がん患者 5 年生存率[1]



I 期	89.3%
II 期	72%
III期	23.8%
IV期	11.6%

図 1-2. 卵巣がん患者の発見時の病期[1]

### 1-1-3. 卵巣がんの病理学的分類

卵巣は、組織学的に表層上皮細胞、胚細胞、間質細胞よりなるが、これらはいずれもがんの発生母地となる。このため、卵巣がんは多彩な組織像を呈することになる[6]。卵巣がんはこれらの細胞から発生してくるものと考えられており、どの部位にがんが発生したかにより腫瘍の性質が異なる（図 1-3. [7]）。

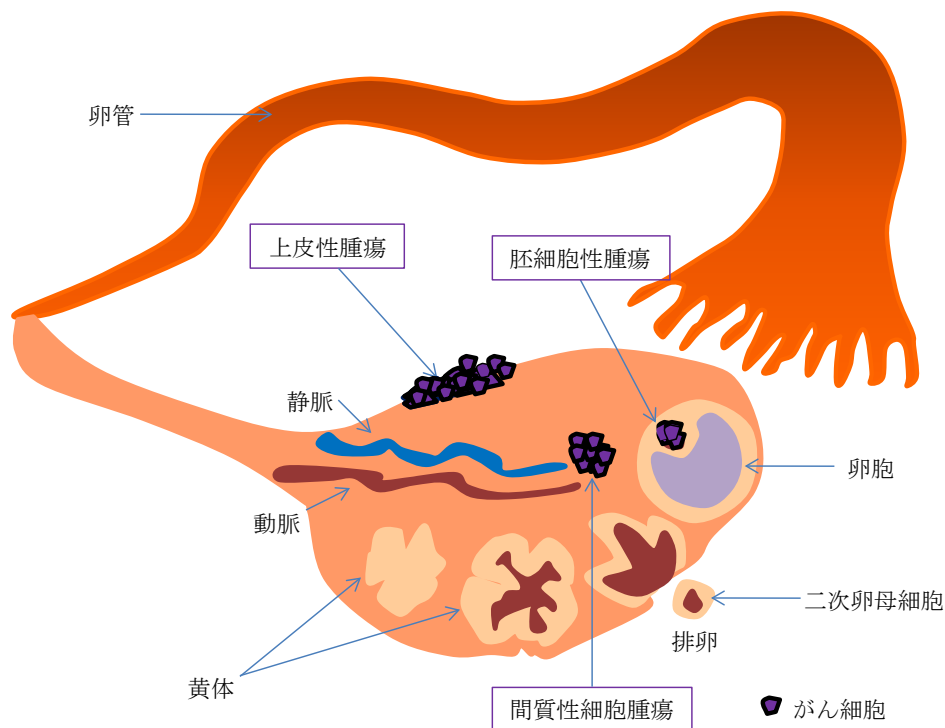


図 1-3. 卵巣の構造と腫瘍の発生場所[7]

WHO による卵巣腫瘍の分類では組織発生を踏まえて表層性・間質性腫瘍、性索間質性腫瘍、胚細胞腫瘍、その他（性腺芽腫、卵巣網の腫瘍、中皮性腫瘍、悪性リンパ腫、その他）に分類され、さらに病理学的観点から良性、境界悪性、悪性に分類されている[8]。最も発生率が高いのは表層上皮性・間質性腫瘍であり、卵巣腫瘍の約 50%を占めている。日本では悪性卵巣腫瘍の約 70～75%、欧米では 90%を表層上皮性・間質性腫瘍が占める[9]。表層上皮性・間質性腫瘍の中でもさらに分類されており、以下に主な組織型を示す（表 1-2.）。

表 1-2. 表層上皮性・間質性腫瘍の主な分類[6, 10, 11]

組織像	組織型	組織学的特徴	化学療法感受性
	漿液性腺癌	<ul style="list-style-type: none"> <li>・円柱状細胞の重層化</li> <li>・乳頭状構造</li> </ul>	高い
	粘液性腺癌	<ul style="list-style-type: none"> <li>・胞体内に粘液を有する細胞</li> </ul>	低い
	類内膜腺癌	<ul style="list-style-type: none"> <li>・高円柱状細胞</li> </ul>	高い
	明細胞腺癌	<ul style="list-style-type: none"> <li>・淡明な胞体を有する細胞あるいはhobnail型細胞</li> </ul>	低い

#### 1-1-4. 卵巣がん治療の現状と問題点

卵巣がんの治療は他臓器がんと同様に、原則としてまず外科的切除により腫瘍を摘出することから始まる[12]。しかしながら診断時の約半数ががん性腹膜炎や腹水を伴う進行症例である為、手術療法に薬物療法を組み入れた集学的治療が行われる[13]。卵巣癌は化学療法が奏功する症例が多い腫瘍であり、また術後の再発頻度が高いことから、多くの症例が化学療法の対象となる[14]。現在卵巣がん化学療法の第一選択として TC (TXL/CBDCA) 療法があり、これは Paclitaxel と Carboplatin を併用した治療法である。しかしながらプラチナ製剤に対する感受性が低いとされる粘液性腺がんや明細胞腺がんの治療法については、ガイドラインにも十分な記載がされていない。TC 療法の明細胞がんに対する奏効率は 11.1%、漿液性がんに対する奏効率は 72.5%という臨床結果も報告されている[15]。薬物療法を受け続ける必要がある患者の割合が高いのにも関わらず、第一選択薬として推奨される薬剤がない症例がある現状は、臨床上大きな問題であるといえる。

## 1-2. Drug Delivery System (DDS)

### 1-2-1. DDS 製剤とは

薬を投与した際、大部分は生体内で分解されたり、肝臓で代謝されたり、正常組織に作用して副作用を引き起こしてしまい、実際に患部まで到達し薬効を示すのはほんのわずかな量でしかない。このような薬物送達における欠点を改善する技術が DDS と呼ばれている[16]。すなわちがん治療における DDS とは、薬物を選択的にがん組織内に到達させることで、副作用を抑えて効果的に薬効を発揮させようとする薬剤送達技術のことである[16]。

この技術を用いることで期待されるメリットは、がん組織内へ薬剤が選択的に集積することによる効果の増強、正常組織への分布減少による副作用の軽減、薬剤使用の利便性を向上させることで患者及び医療従事者の負担を軽減できること、副作用対策の医療費を削減できることが挙げられる。

このがん組織へ集中的に薬物を到達させる方法論のもととなるメカニズムとして、Enhanced permeability and retention (EPR) 効果が挙げられる[16]。これは、正常組織と腫瘍組織の脈管構造の違いに基づいて高分子物質が腫瘍特異的に漏出し、長時間蓄積する効果のことである。すなわち正常組織では血管構造が密で間隙が小さく、高分子物質は血管外組織へ漏れ出しにくい。漏れ出したとしても、リンパ管により回収される。一方固形腫瘍組織においては、腫瘍血管構造が正常血管に比べて疎である為に著しい血管透過性の亢進が起こっている。また、血管の増生に見合ったリンパ回収系の増生が少ない。従って正常血管では血管外に漏れ出しにくい高分子物質であっても、腫瘍血管からは漏出しやすく、一旦腫瘍組織に漏出した高分子物質はその場に滞留しやすい (図 1-4.)。EPR 効果を利用するために抗がん剤をナノメートルサイズの担体により分子修飾することで、薬剤の腫瘍への選択的到達率を高め、がんに対する治療効果を高めると共に副作用を軽減させることを目的とした研究が盛んに行われている。抗体、micelle 及び liposome など多種多様な素材が DDS 製剤として用いられ、温度感受性ミセル製剤[17]や腫瘍新生血管標的化リポソーム[18]といった新規 DDS 製剤が次々と開発されている。

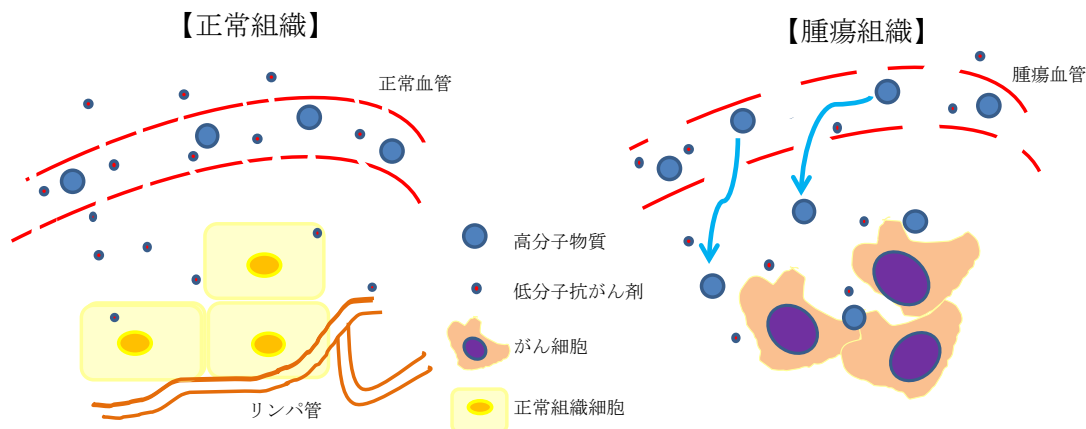


図 1-4. EPR 効果の概念図

低分子物質は、非選択的に血管から正常組織及び腫瘍組織に漏れ出す。一方高分子物質においては、脈管系の違いにより正常組織へ漏れ出しにくく、かつ腫瘍組織に漏出しやすく長時間滞留しやすい。

### 1-2-2. NC6300 の特徴

NC6300 とは pH 応答性 Epirubicin 内包 micelle 製剤であり、ナノキャリア株式会社によって開発されたDDS製剤のひとつである。NC6300 は、親水性の polyethylene glycol と疎水性のペプチド共重合体からなる block copolymer の疎水性鎖に抗がん剤 Epirubicin がアゾメチン結合しており、pHの低下に依存して結合が解離する仕組みとなっている（図1-4.）。これら内側の疎水性分子を包み込むように polyethylene glycol (PEG) が存在し、水系における自己集積 (self assembly) により内側にペプチド共重合体とEpirubicinを有するナノパーティクルを形成する。分子量は12 kDaであり、micelle の平均粒子径は60 nm で設計されている[19]。

NC6300に内包されているEpirubicin はアントラサイクリン系抗がん剤であり、作用機序は2つにわけられる。

- ① DNA とインターカレーションを起こし、DNA- Topoisomerase II (Top2) との複合体を形成し、正常な複製を妨げることで細胞障害を引き起こす[20]。
- ② 酸化還元反応の触媒として作用し、フリーラジカル酸素の産生を促進する[21]。

以上の機序より抗腫瘍効果を示す。

また Epirubicin は、乳がん、食道がん、胃がん、卵巣がんホジキンリンパ腫などに認可されており、適応範囲の広い抗がん剤である。立体異性体（エピマー）である Doxorubicin と比較して吐気、嘔吐、脱毛、心毒性といった副作用がやや少ないという特徴を持つ[22]。

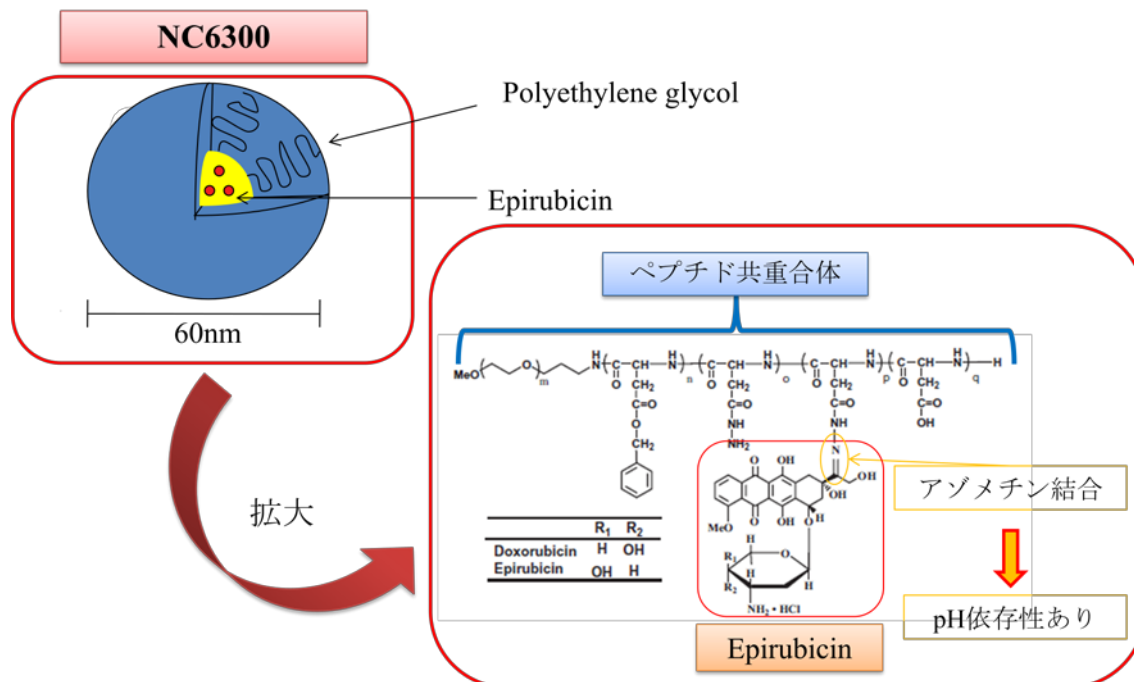


図 1-4. NC6300 の構造

### 1-2-3. NC6300 のメリット

NC6300 を治療に用いるメリットは、以下の 3 点が挙げられる。

- ① 血中滞留性の向上。micelle を PEG で外包している為、クッパー細胞やマクロファージといった貪食細胞との相互作用が弱まり、貪食作用からの回避が可能になること、さらには pH 応答性 micelle なので血中で分解しにくく、長時間循環できることに起因する。
- ② 抗腫瘍効果の増強。EPR 効果を利用して、がん細胞に高濃度に集積して高い治療効果をあげることが期待できる。
- ③ 副作用の軽減。高分子物質は正常血管外への移行性は低く、正常組織に分布する抗がん剤の濃度を減らすことができる。

### 1-3. 研究目的

以上の背景より、化学療法抵抗性卵巣がんや再発性卵巣がんに対する治療法は確立されておらず、治療の選択肢を広げる手段として新規抗がん剤の開発が有効であると考えられる。また、卵巣がんは外科的切除による根治が望めない症例の多くは化学療法の対象となる。その場合、治療を続ける限り患者は生涯抗がん剤と付き合いしていくことになるであろう。患者の負担を軽減し、最期まで安心して治療が行えるよう、治療効果のみでなく副作用にも焦点を当てた薬剤の開発が必要であると考ええる。

そこで本研究は、新規製剤として、DDS 製剤である NC6300 の卵巣がんに対する治療効果及び毒性の評価のために前臨床試験を行うこととした。

また、比較対象は内包されている抗がん剤 Epirubicin とした。これは、新規薬物である NC6300 の薬効や安全面の検証の為、また低分子抗がん剤と micelle 製剤の比較検討を行う為である。



## 第 2 章 実験方法

## 2-1. 細胞培養

### 2-1-1. 細胞株

本研究において用いた細胞株とその特性について以下に示す。

尚、全ての細胞株は American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA) から購入した。

表 2-1. 使用した卵巣がん細胞株の臨床病理学的分類 [23]

細胞株	由来	組織
Caov-3	上皮性細胞	漿液性嚢胞腺癌
ES-2	繊維芽細胞	明細胞癌
MCAS	上皮性細胞	粘液性嚢胞腺癌
OVCAR-3	上皮性細胞	漿液性嚢胞腺癌
SKOV-3	上皮性細胞	漿液性嚢胞腺癌

### 2-1-2. 細胞培養及び継代方法

ES-2, Caov-3, OVCAR-3, MCAS の培養では、D-MEM Low Glucose (Wako 社) に終濃度で 10% Fetal Bovine Serum (FBS) (Tissue Culture Biologicals 社), 2 mmol/l L-Glutamine (Wako 社), 100 units Penicillin – 100 µg Streptomycin – 250 ng/ml Amphotericin B 懸濁液 (Wako 社) となるよう調整した培養液を使用した。また SKOV-3 の培養では McCoy's 5A medium に上記と同様の添加剤を加えた培養液を使用した。細胞培養は 37°C, 5.0%CO<sub>2</sub> インキュベーター内で行い、1～2 日おきに培養液を交換した。培養細胞が 150 mm Dish (Corning 社) 上で 80% confluent に達した時点で継代を行った。まずクリーンベンチ内にて培養液を除去し、10 ml の Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (DPBS) (Invitrogen 社) を加えて 2 回洗浄し死細胞を除去した。その後 2 ml の 0.25% Trypsin-EDTA (Wako 社) を加えて、CO<sub>2</sub> インキュベーター内に数分間放置した。位相差顕微鏡にて細胞がシャーレの底面から剥がれていることを確認した後、培養液を加えて、細胞懸濁液を 50 ml centrifuge tube (Corning 社) に回収した。回収した細胞懸濁液は 1200 rpm, 4 min, 4°C の条件で遠心して、上清を除去後、10 ml の培養液に再懸濁した。新しい 150 mm Dish に 25 ml の培養液を加え、そこへ細胞懸濁液を適量加えた。Dish 内の培養液を揺らして細胞密度を均一にした後、インキュベーター内にて培養した。

### 2-1-3. 細胞保存方法

培養細胞が150 mm Dish 上で80%confluent 状態に達していることを位相差顕微鏡にて確認した後、上述の方法で細胞懸濁液を50 ml centrifuge tube に回収して遠心分離を行い、上清の除去を行った。続いて、細胞50万～500万個/ml となるようセルバンカー（日本全薬工業株式会社）を加えてピペティングを行い、Cryo Tube Vial (Cryotube Vials, nunc 社) に0.8 ml ずつ分注した。一時保存の場合はそのまま-80℃に保存し、長期保存の場合は -80℃に一晚保存し、翌日液体窒素内へ移動し保存した。

### 2-2. 薬剤

本研究において用いた薬剤について以下に示す。

表 2-2. 使用した抗がん剤

抗がん剤	分類	作用機序	製造販売元
NC6300	アントラサイクリン系	Topoisomerase II 阻害	Nano Carrier Co., Ltd.
Epirubicin	アントラサイクリン系	Topoisomerase II 阻害	ファイザー株式会社
Doxorubicin	アントラサイクリン系	Topoisomerase II 阻害	協和発酵キリン株式会社
Paclitaxel	タキサン系	微小管阻害	ブリストル・マイヤーズ株式会社
Carboplatin	白金系	DNAと結合	ブリストル・マイヤーズ株式会社

## 2-3. NC6300 の pH の異なる溶液中での Epirubicin の経時的リリース能の変化

### 2-3-1. sample の作成方法

pH 3.0 ギ酸緩衝液, pH 4.8 酢酸緩衝液, pH 7.4 リン酸緩衝液をそれぞれ調整した。各緩衝液 950  $\mu$ l に NC6300 (2 mg/ml), Epirubicin (2 mg/ml) をそれぞれ 50  $\mu$ l 加えた反応液を作成し、Dry Thermo Unit DTU-18 (TAITEC 社) を用いて 37°C でインキュベートした。投与直後、投与後 2, 4, 12, 24 時間で各反応液を 50  $\mu$ l 採取し、内部標準物質である Daunorubicin (2  $\mu$ g/ml) を 50  $\mu$ l 加え攪拌し、sample を作成した。

### 2-3-2. High Performance Liquid Chromatography (HPLC) による測定

HPLC装置はalliance (Waters社)、分析カラムには逆相クロマトグラフィー用カラムである TSKgel ODS-80TM (4.6 $\times$ 150 mm) (東ソー株式会社) を使用した。使用条件をカラム温度 40°C、サンプル温度4°C、流速1 ml/min に設定し、1 サンプル当たり 20  $\mu$ l 注入し、測定時間は15分とした。流す移動相の組成は25 mM Formic acid ammonium : CH<sub>3</sub>CN=7 : 3とし、十分に流してカラム内の圧が安定してから sample を注入した。蛍光検出器はMulti  $\lambda$  Fluorescence Detector (Waters社) を使用し、励起波長488nm、蛍光波長560 nm に設定した[24]。各pH緩衝液にEpirubicinを加えた sample の測定値をNC6300のEpirubicin リリース能100% と設定し、NC6300のEpirubicin リリース能を算出した。

## 2-4. 殺細胞効果測定

培養細胞における NC6300, Epirubicin, Taxol, Cisplatin, Doxorubicin の殺細胞効果を比較検討する為に Cell Counting Kit-8 (CCK-8) (同仁化学社) を用いて細胞毒性試験を行った。

96 well plate にがん細胞を 3000 cells/100  $\mu$ l medium/well ずつ播種し、24 時間 CO<sub>2</sub> インキュベーター内で培養した。100  $\mu$ M - 0.1 nM の薬剤希釈系列を作成し、各 well に 100  $\mu$ l 添加して 72 時間 CO<sub>2</sub> インキュベーター内で培養した。その後培養液を取り除き、CCK-8 溶液 : 培養液=1 : 9 に調整した反応液を添加し CO<sub>2</sub> インキュベーター内で 2 時間 30 分反応させた後、マイクロプレートリーダー (SPECTRA MAX190、日本モレキュラーデバイス株式会社) にて 450 nm における吸光度を測定した。Control 群を 100% とし、各薬剤添加群における細胞生存率を測定した。測定結果より、がん細胞の 50% 増殖抑制効果を示す時の薬剤濃度である 50% inhibitory concentration (IC<sub>50</sub>) を求めた。

## 2-5. 抗腫瘍効果の検討

### 2-5-1. 卵巣がん皮下腫瘍マウスモデルの作製

卵巣がん細胞である ES-2 を 0.25% Trypsin-EDTA にて 150 mm dish から剥がし、細胞懸濁液を 15 ml tube に移して遠心分離し上清を吸引除去した。15 ml tube に PBS を加えて懸濁し、 $3 \times 10^6$  cells/100  $\mu$ l となるよう調整した。4 週齢の雌ヌードマウス BALB-c slc nu/nu (日本 SLC 社) の右背部皮下に 20 G 注射針を用いて 100  $\mu$ l 注入した。

### 2-5-2. 皮下腫瘍マウスモデルを用いた治療実験

卵巣がん細胞 ES-2 を皮下に移植後、ヌードマウス右背部に腫瘍が形成されていることを確認し、週 2 回ノギスを用いて腫瘍体積を計測した。腫瘍の長径 (L) と短径 (W) を測定し、以下の公式にて腫瘍体積の算出を行った。

$$\text{腫瘍体積 (mm}^3\text{)} = L \times W^2 \times 1/2$$

腫瘍体積が 200 mm<sup>3</sup> に達したマウスを選択し、表 2-2. に示すように各群 5 匹に分けて NC6300, Epirubicin, PBS を週 1 回 3 週連続で 24G 針を用いて尾静脈内注射 (intravenous injection : i.v.) にて投与し、治療実験を行った。実験開始後、腫瘍体積を週 2 回計測した。また投与する薬剤の濃度は過去の文献を参考にして Epirubicin は 10 mg/kg, NC6300 は 10, 15 mg/kg とした[25]。

表 2-3. 皮下腫瘍マウスモデル治療実験群の分類

群	投与薬剤・投与量
PBS 群	PBS 300 $\mu$ l 投与
Epirubicin 10 mg/kg 群	Epirubicin 10 mg/kg/300 $\mu$ l 投与
NC6300 10 mg/kg 群	NC6300 10 mg/kg/300 $\mu$ l 投与
NC6300 15 mg/kg 群	NC6300 15 mg/kg/300 $\mu$ l 投与

## 2-6. 薬物動態学的検討

### 2-6-1. HPLC による薬剤濃度の測定

#### 2-6-1-1. 検量線の作成

前述の方法 (2-4-1.) にて作製した卵巣がん皮下腫瘍マウスモデルから心臓、卵巣、皮下腫瘍と血漿を採取した。採取した各組織は生理食塩水で洗浄後、分析天秤 (METTLER TOLEDO) で重量を測定した組織をハサミで細かく刻み Precellys Lysing Kit tube (bertin technologies) に入れ、さらに組織の重量 (g) に対し 3 倍量の DPBS を加えた。ビーズ式ホモゲナイザーである precellys 24 (bertin technologies) を用いて Sample をホモゲナイズし、40  $\mu$ l を 1.5 ml tube に移し取った。血漿は抗凝固剤ヘパリンを表面に付着させた 24 G 注射針を用いて下大静脈より血液を採取し、その後遠心分離 (10000 rpm, 10 min, 4°C) により採取した血漿のうち 40  $\mu$ l を 1.5 ml tube に移し取った。Epirubicin 濃度の検量線を作成する場合は 1.5 ml tube に 1, 2, 10, 50, 100, 500, 1000 ng/ml に調整した Epirubicin 溶液 10  $\mu$ l を加えて CH<sub>3</sub>CN 130  $\mu$ l と 1%TritonX-100 を 25  $\mu$ l 加えて vortex し、遠心分離 (10000 rpm, 10 min, 4°C) を行った。上清 75  $\mu$ l を新しい 1.5 ml tube に回収し、2  $\mu$ g/ml Daunorubicin 75  $\mu$ l を加えて vortex にかけて sample 液を作成した。NC6300 濃度を測定する場合は 1, 2, 10, 50, 100, 500, 1000 ng/ml に調整した NC6300 溶液 10  $\mu$ l を加えて 1.5 ml tube に CH<sub>3</sub>CN 110  $\mu$ l, 1N HCl 20  $\mu$ l と 1%TritonX-100 を 25  $\mu$ l 加えて vortex し、室温で 1 時間静置した。その後遠心分離 (10000 rpm, 10 min, 4°C) を行い、上清 75  $\mu$ l を新しい 1.5 ml tube に回収した。2  $\mu$ g/ml Daunorubicin 75  $\mu$ l を加えて vortex にかけて sample 液を作成した。以上のようにして作成した sample 液を HPLC 用 sample tube に全量移し、前述した HPLC での薬剤濃度の測定方法 (2-2-2.) に従って測定した。内部標準物質である Daunorubicin の測定値に対する Epirubicin の測定値の比を算出し、投入した薬剤の濃度 (1, 2, 10, 50, 100, 500, 1000 ng/ml) と測定値の関係をグラフとして表し、検量線を作成した[26]。

#### 2-6-1-2. sample の作成・採取方法

卵巣がん細胞株 ES-2 を用いて作製した皮下腫瘍マウスモデルを無作為に Epirubicin 投与群、NC6300 投与群の 2 群に分けて各薬剤 10 mg/kg を 24 G 注射針にて投与した。薬剤投与後 0, 6, 12, 24, 72, 168 時間で両群のマウスを sacrifice し、血漿、心臓、卵巣及び皮下腫瘍を採取した。sample の採取方法は、血漿は抗凝固剤ヘパリンを表面に付着

させた 24 G 注射針を用いて血液を採取しその後遠心分離 (10000 rpm, 10 min, 4℃) により血漿を採取した。各組織は採取後ただちに生理食塩水で洗浄後、分析天秤で重量を測定した組織をハサミで細かく刻み Precellys Lysing Kit tube に入れ、さらに組織の重量 (g) に対し 3 倍量の PBS を加えて ホモゲナイズ処理を行った。その後遠心分離 (1200 rpm, 5 min, 4℃) を行い、その上清を組織液として使用した。採取した血漿及び組織液は速やかに -20℃で凍結して濃度測定まで保存した。

### 2-6-1-3. 薬剤の濃度測定方法

前述の方法 (2-6-1-2.) で作成した sample 50 µl を 1.5 ml tube に移し取った。Epirubicin 濃度を測定する場合、1.5 ml tube に CH<sub>3</sub>CN 130 µl と 1%TritonX-100 を 25 µl 加えて vortex し、遠心分離 (10000 rpm, 10 min, 4℃) を行った。上清 75 µl を新しい 1.5 ml tube に回収し、2 µg/ml Daunorubicin 75 µl を加えて vortex にかけて sample 液を作成した。NC6300 濃度を測定する場合、1.5 ml tube に CH<sub>3</sub>CN 130 µl、1N HCl 20 µl と 1% TritonX-100 を 25 µl 加えて vortex し、室温で 1 時間静置した。その後遠心分離 (10000 rpm, 10 min, 4℃) を行い、上清 75 µl を新しい 1.5 ml tube に回収した。2 µg/ml Daunorubicin 75 µl を加えて vortex し、sample 液を作成した。以上のようにして作成した sample 液を HPLC 用 sample tube に全量移し、前述した HPLC での薬剤濃度の測定方法 (2-2-2.) に従って測定した。

### 2-6-2. AUC (Area under the concentration time curve 濃度曲線下面積) の算出

AUC とは、縦軸に薬物濃度、横軸に時間となるようグラフ化したときの濃度曲線下の面積である。AUC とはその組織に到達した薬物の総量の指標となる。AUC の求め方は、ある時間ごとに区切りをつけ、それぞれを台形とみなして求めた面積の総和である (図 2-1.)。上述の方法 (2-6-1) にて各時間における薬剤濃度を測定し、得られた値を台形の公式に当てはめて各薬剤の AUC を求めた。

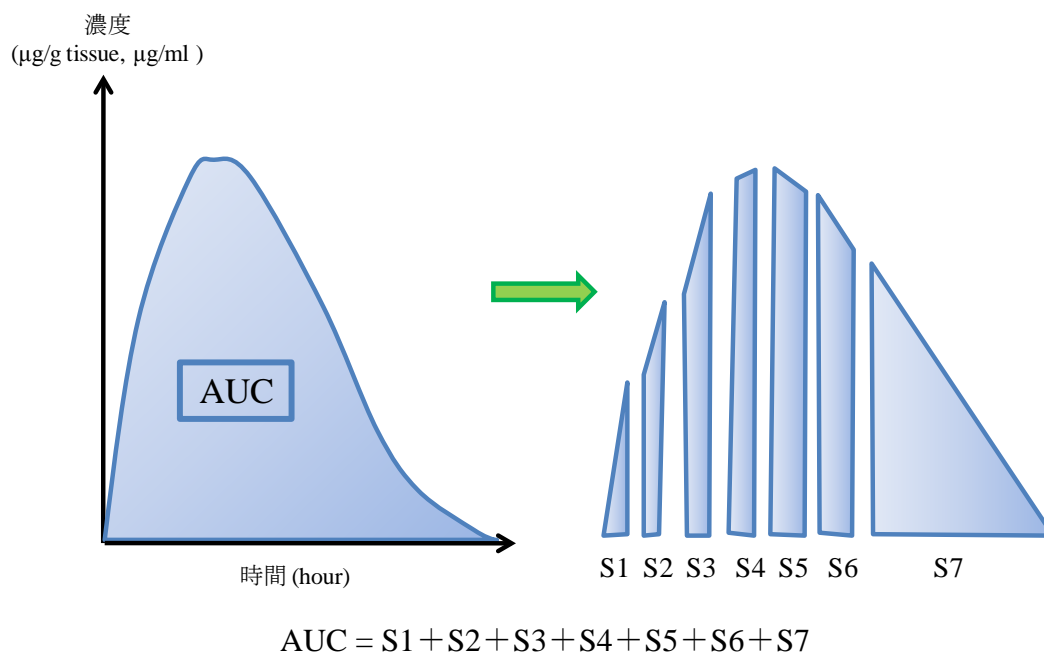


図 2-1. AUC の求め方

## 2-7. 心エコーによる非侵襲的心機能の測定

アントラサイクリン系抗がん剤に特徴的な副作用である心毒性を検討する為に小動物用超音波高解像度イメージングシステム Vevo770 (プライムテック社) を用いて心筋収縮力を測定した。

### 2-7-1. 薬剤投与条件と実験スケジュール

5 週齢の C57BL マウス雌 (Charles River Japan, Inc.) に NC6300 (10 mg/kg), Epirubicin (10 mg/kg), Doxorubicin (5 mg/kg), PBS を週 1 回投与し、定期的に心エコーにて心毒性を評価した。長期毒性をみる為に 3 回投与後一週間の休薬期間を設けて、計 9 回薬剤投与を行った (図 2-2)。

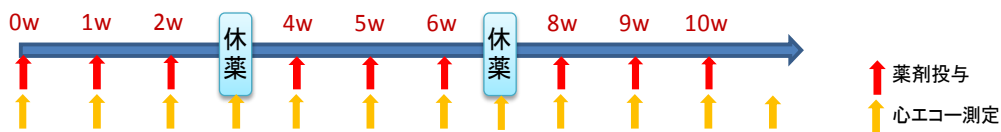


図 2-2. 心エコー実験スケジュール



### 2-7-2. 心エコーによる測定方法

心エコー測定にはイメージングシステム Vevo770 を用いた。濃度 1.5% のフォーレン吸入麻酔 (アボットジャパン株式会社) 下でマウスの四肢を固定した。エコー用ジェル Eco Gel 100 (Eco-Med Pharmaceutical Inc.) を上前胸に塗布した。心エコー用プローブ RMV-704 を mouse の上前胸やや心臓側に当て、図 2-3. のように左心室の乳頭筋が画面上に移る位置で固定した。測定断面は左心室の乳頭筋が入る乳頭筋レベルの画像とした[27]。

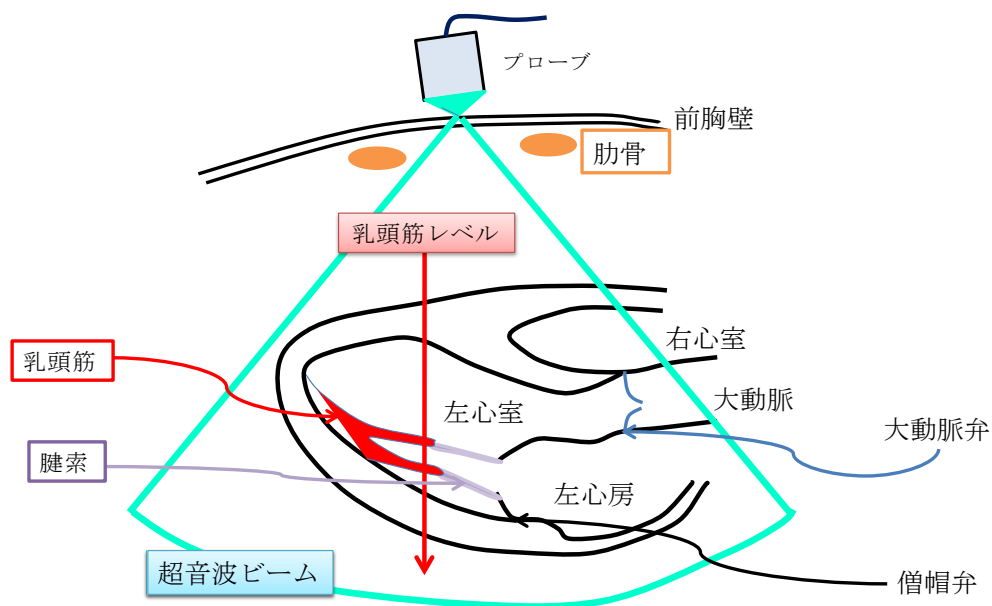


図 2-3. 心エコー断面図

反射信号の強度をブラウン管上で輝度変調を行う表示法である B-mode にて乳頭筋、左心室、大動脈が確認できる位置に固定し、反射源の時間的位置変化を記録する表示法である M-mode に切り替えた。乳頭筋レベルで切断した M-mode 画像中の左室拡張期径 (LVDd) と左室収縮期径 (LVDs) を測定した (図 2-4.)。

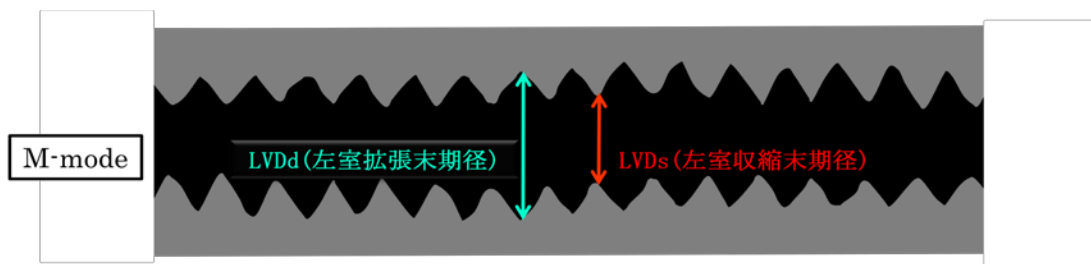


図 2-4. M-mode 画像の左室拡張期径と左室収縮期径の位置

### 2-7-3. Ejection Fraction (EF : 左室駆出率) 及び Fractional Shortening (FS : 左室内径短絡率) の数値測定方法

心筋収縮力の指標として EF, FS を算出した。EF の定義は、左室 1 回拍出量 stroke volume (SV) の左室拡張期容積 left ventricular end-diastolic volume (LVEDV) に対する割合であり、正常値は 55%以上である[28]。FS とは左室拡張末期径と左室収縮末期径を計測し、両者の差を左室拡張末期径で除し 100 分率で表した値である。左室心筋収縮力の指標のひとつで、正常値は 30~50%である[28]。心エコー実験により得られた測定値を以下の公式に当てはめ EF, FS 値を計算し、心筋収縮力を評価した。

$$\%EF = SV/LVEDV \times 100 = (LVEDV - LVESV)/LVEDV \times 100 (\%)$$

SV (左室一回拍出量)

LVESV (左室収縮期容積)

$$\%FS = (LVDd - LVDs) \times 100 / LVDd$$

LVDd (左室拡張末期径)

LVDs (左室収縮末期径)

## 2-7. 統計解析

本研究での有意差検定には Student's *t*-test を用いた。  
両側検定にて  $P < 0.05$  を統計学的有意差有りとした。

## 第 3 章 実験結果

### 3-1. NC6300 の pH の違いによる Epirubicin リリース能の変化

NC6300 の pH の違いによる内包 Epirubicin の リリース能変化について HPLC を用いて調べた。その結果、実験開始後 24 時間での Epirubicin リリース率は、pH 7.4 では 20%、pH 4.8 では 78%、pH 3.0 では 98%となった(図 3-1.)。pH 3.0 では、実験開始後 2 時間で 60%が release された。pH4.8 では実験開始後 2 時間で 11%であったが、その後直線的に増加した。pH7.4 では実験開始後 2 時間で 3%で、24 時間で 20%のリリース能を示した。

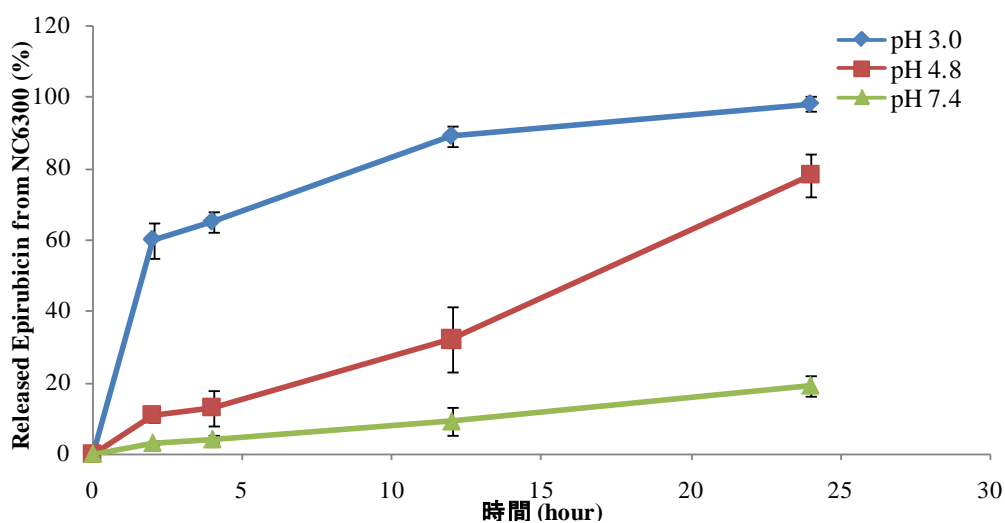


図 3-1. pH による内包 Epirubicin リリース能の変化 (37℃)

37℃の恒温槽下にて、pH 3.0 ギ酸緩衝液、pH4.8 酢酸緩衝液、pH7.4 リン酸緩衝液 950  $\mu$ l にそれぞれ NC6300 2 mg/ml を 50  $\mu$ l 加え、経時的に採取したサンプルの Epirubicin 濃度を HPLC にて測定した。(n=5)

### 3-2. 培養細胞への殺細胞効果の検証

#### 3-2-1. 各種卵巣がん細胞株に対する薬剤の殺細胞効果の検証

*In vitro* における殺細胞効果を検討する為に、測定前日に細胞を撒いた 96 well plate に薬剤を添加し、72 時間後の細胞生存率から各細胞株における  $IC_{50}$  値を算出した。

表 3-1.  $IC_{50}$  ( $\mu$ M, 72hr)

	Epirubicin	Doxorubicin	Paclitaxel	Carboplatin
SKOV-3 (上皮性腺がん)	0.066 $\pm$ 0.005	0.060 $\pm$ 0.004	0.006 $\pm$ 0.0002	68.52 $\pm$ 4.43
Caov-3 (上皮性腺がん)	0.042 $\pm$ 0.007	0.006 $\pm$ 0.0006	0.093 $\pm$ 0.008	5.06 $\pm$ 0.74
ES-2 (明細胞がん)	0.058 $\pm$ 0.002	0.009 $\pm$ 0.0007	0.008 $\pm$ 0.0002	5.74 $\pm$ 0.15
MCAS (粘液性腺がん)	0.047 $\pm$ 0.001	0.009 $\pm$ 0.0004	0.004 $\pm$ 0.002	49.39 $\pm$ 7.51
OVCAR-3 (上皮性腺がん)	0.054 $\pm$ 0.00007	0.076 $\pm$ 0.006	0.004 $\pm$ 0.0008	5.39 $\pm$ 0.43

mean $\pm$ SD, n=5 each

その結果、どの細胞株においても、Epirubicin は Carboplatin よりも高い殺細胞効果を示した。Epirubicin と Doxorubicin を比較すると、SKOV-3 細胞株では同程度の殺細胞効果を示し、Caov-3, ES-2, MCAS 細胞株においては、Epirubicin は Doxorubicin よりも殺細胞効果が弱く、OVCAR-3 細胞株では逆に Epirubicin 方が高い殺細胞効果を示した。Epirubicin と Paclitaxel を比較すると、Caov-3 細胞株を除き、Paclitaxel は Epirubicin の殺細胞効果を上回った。(表 3-1.)。

### 3-2-2. 細胞への暴露時間の違いによる NC6300 の殺細胞効果の変化

細胞株 ES-2 を用いて、Epirubicin, NC6300 の暴露時間を変化させた場合の *in vitro* での殺細胞効果を評価した。薬剤を plate に添加後 24 時間、72 時間、120 時間の細胞生存率を評価して IC<sub>50</sub> 値を算出し、両薬剤の数値を比較した。NC6300 の IC<sub>50</sub> 値は、NC6300 添加後 24 時間で 3.30、72 時間で 0.38、120 時間で 0.046 となり、Epirubicin と比較して薬剤を接触させる時間に比例して大幅に減少し、殺細胞効果が上昇した。またいずれの接触時間においても Epirubicin の方がより高い殺細胞効果を示したが、NC6300 と Epirubicin の IC<sub>50</sub> 値の比は、薬剤添加後 24 時間では 42.86、72 時間で 6.55、120 時間で 6.30 を示し、接触時間の延長に伴いその差は縮小することが確認できた (表 3-2.)。

表 3-2. Epirubicin と NC6300 の IC<sub>50</sub> 値 (μM) の比較

	Epirubicin	NC6300	NC6300/Epirubicin
24hr	0.077±0.002	3.30±1.94	42.86
72hr	0.058±0.002	0.38±0.02	6.55
120hr	0.0073±0.0002	0.046±0.001	6.30

mean±SD, n=3 each

### 3-3. 各臓器における薬物動態学的検討

NC6300 と Epirubicin の血中及び組織中における薬物動態を比較するために、皮下腫瘍マウスモデルに Epirubicin 及び NC6300 を投与し、経時的に回収した臓器及び血漿内の Epirubicin 濃度を HPLC にて測定した。

#### 3-3-1. 血漿中の薬剤濃度の時間的推移

Epirubicin 投与群の血漿中 Epirubicin 濃度は、投与後 0.5 時間で最大値を示し、その後速やかに低下し、投与後 12 時間では検出限界以下にまで低下していた。一方 NC6300 群の Epirubicin 濃度は、投与後緩徐に上昇し、12 時間後に最高濃度を示した。投与後 168 時間では血漿中 Epirubicin 濃度は検出限界に達した。投与後 6 時間以降はどの時間においても NC6300 群は Epirubicin 群と比較して血漿中の Epirubicin 濃度が高値を示し、有意差を認めた ( $P < 0.05$ 、図 3-2)。

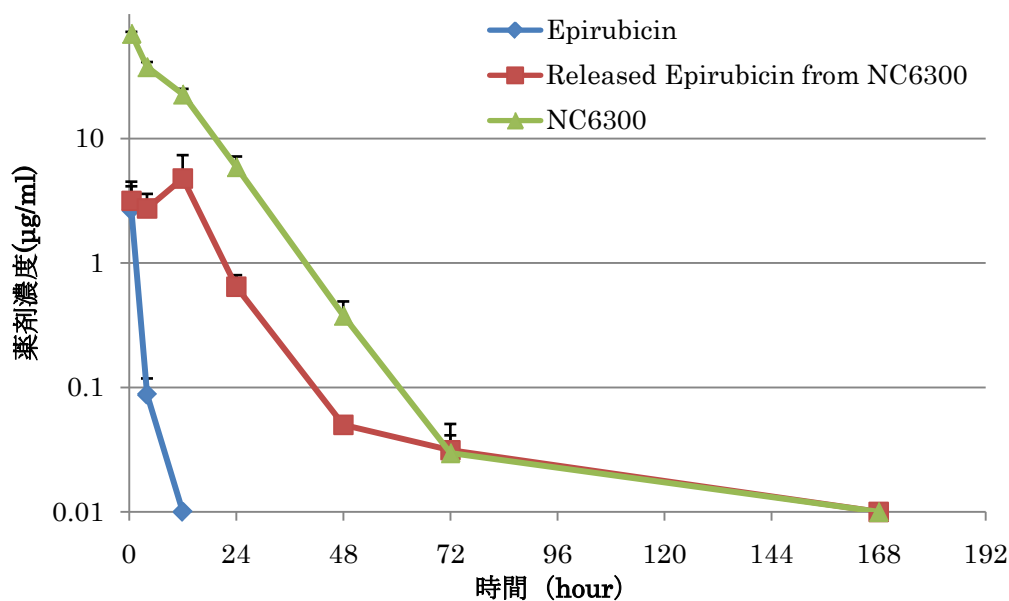


図 3-2. 血漿中の薬物濃度の変化

皮下腫瘍マウスモデルに NC6300, Epirubicin を i.v. にて投与し、投与後 0.5, 6, 12, 24, 48, 72, 168 に血漿を採取して HPLC にて Epirubicin 濃度を測定した。( $n=3$ )

### 3-3-2. 組織中の薬剤濃度の時間的推移

腫瘍組織及び心臓、卵巣組織中の薬物動態を調べる為に、Epirubicin 投与群, NC6300 投与群の各々の組織内薬剤濃度を測定した。薬剤投与後 0.5 時間では、Epirubicin 群はすべての組織において NC6300 群の Epirubicin よりも高値を示した (図 3-3. 3-4. 3-5.)。心臓、卵巣組織では投与後 24 時間まで Epirubicin 群の Epirubicin 濃度は NC6300 群よりも高値を示すのに対して腫瘍組織では投与後 12 時間で NC6300 群の Epirubicin 濃度が Epirubicin 群を上回った。また、NC6300 投与群において投与後 168 時間では心臓、卵巣組織中の Epirubicin 濃度は検出限界を下回ったのに対して、腫瘍組織では Epirubicin が検出された。

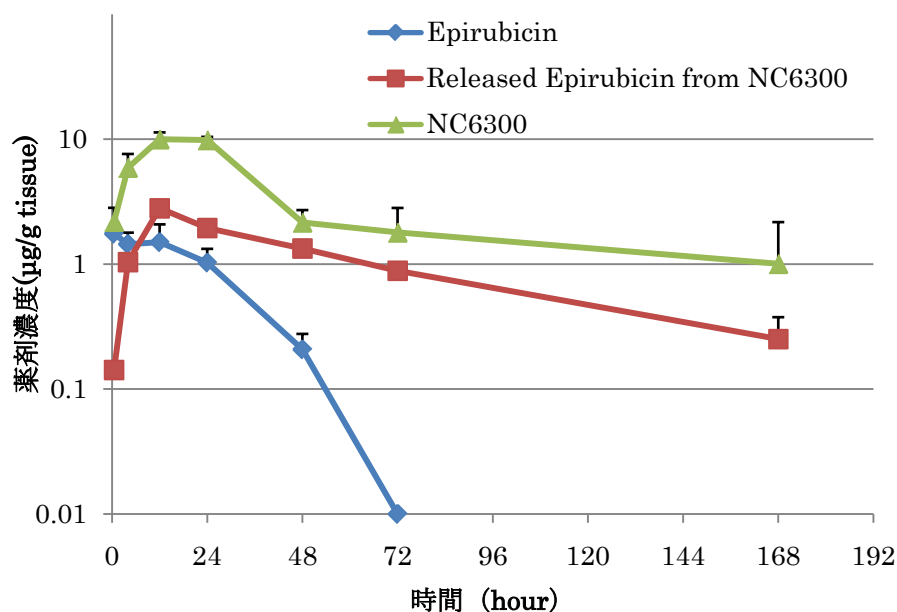


図 3-3. 腫瘍組織中の薬物濃度の変化

皮下腫瘍マウスモデルに NC6300, Epirubicin を一回 i.v.にて投与し、投与後 0, 6, 12, 24, 48, 72, 168 時間に腫瘍を採取して HPLC にて Epirubicin 濃度を測定した。(n=3)



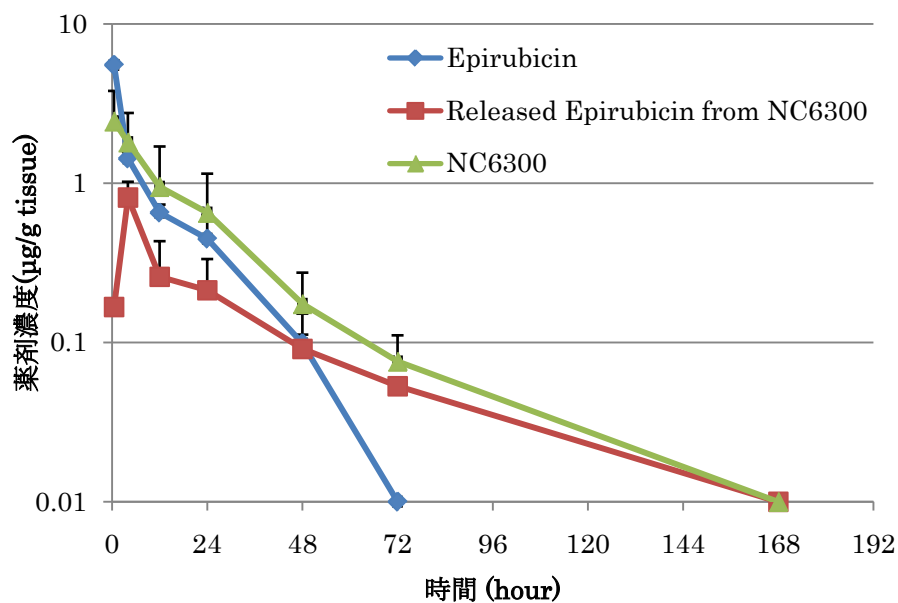


図 3-4. 心臓組織中の薬物濃度の変化

皮下腫瘍マウスモデルに NC6300, Epirubicin を一回 i.v. にて投与し、投与後 0, 6, 12, 24, 48, 72, 168 時間に心臓を採取して HPLC にて Epirubicin 濃度を測定した。(n=3)

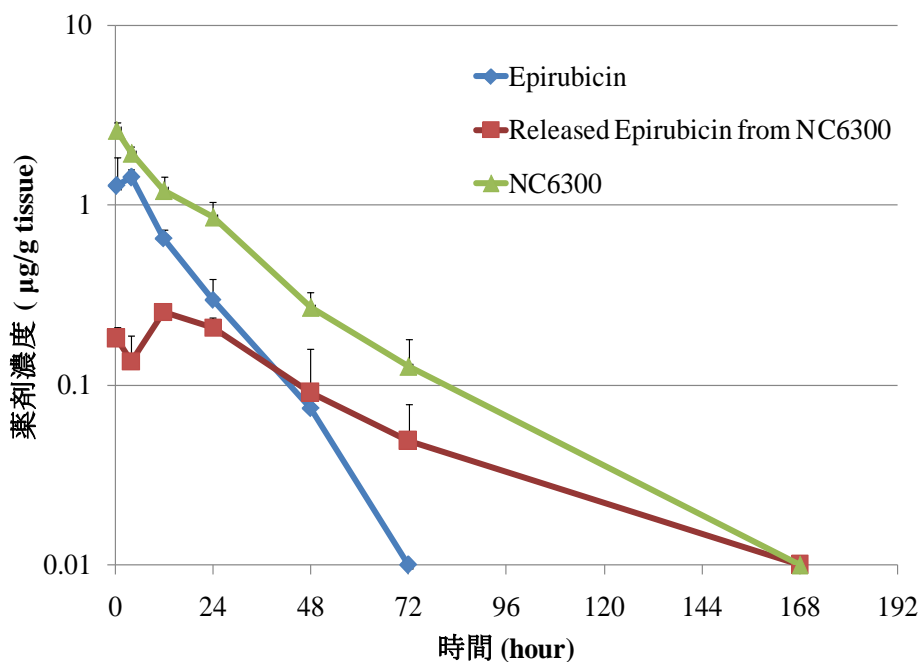


図 3-5. 卵巣組織中の薬物濃度の変化

皮下腫瘍マウスモデルに NC6300, Epirubicin を一回 i.v. にて投与し、投与後 0, 6, 12, 24, 48, 72, 168 時間に卵巣を採取して HPLC にて Epirubicin 濃度を測定した。(n=3)

### 3-3-3. 血漿中及び組織中の薬物動態

Epirubicin, NC6300 投与群における各組織の 168 時間後までの薬物濃度曲線下面積 (AUC)を算出した。その結果、血漿中での NC6300 群の AUC は Epirubicin 群よりも約 12 倍、腫瘍組織内での NC6300 群の AUC は Epirubicin 群よりも約 9 倍上昇していた。一方、心臓や卵巣の正常組織では Epirubicin 群が NC6300 群を上回った (図 3-6.)。

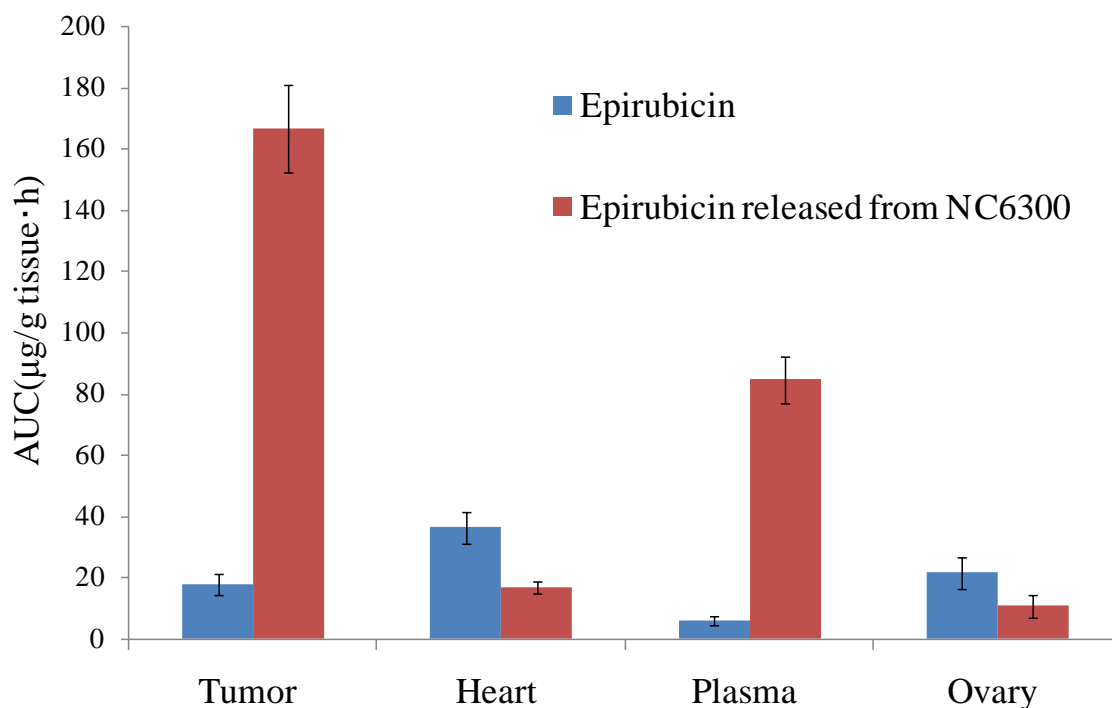


図 3-6. 各臓器での AUC の比較

NC6300 投与群, Epirubicin 投与群の薬物動態を HPLC にて測定し、AUC を求めた。(n=3)

### 3-4. 皮下腫瘍マウスモデルを用いた治療実験

*In vivo* での NC6300 の抗がん作用を検討する為に、ES-2 皮下移植マウスモデルを用いて治療実験を行った。用いた薬剤は Epirubicin (10 mg/kg), NC6300 (10 mg/kg, 15 mg/kg), PBS とした。その結果、Epirubicin 10 mg/kg 投与群、NC6300 10 mg/kg 投与群、NC6300 15 mg/kg 投与群は、いずれもコントロール群である PBS 投与群よりも有意に腫瘍体積が減少した。また治療開始後 27 日目と 30 日目で同等量 (10 mg/kg) 投与した Epirubicin 群と NC6300 群を比較すると、NC6300 群の方が有意に抗腫瘍効果を示した (day27:P = 0.0235, day30 : P = 0.0192, NC6300 10 mg/kg vs Epirubicin 10 mg/kg, Student's *t*-test, 図 3-7.)。

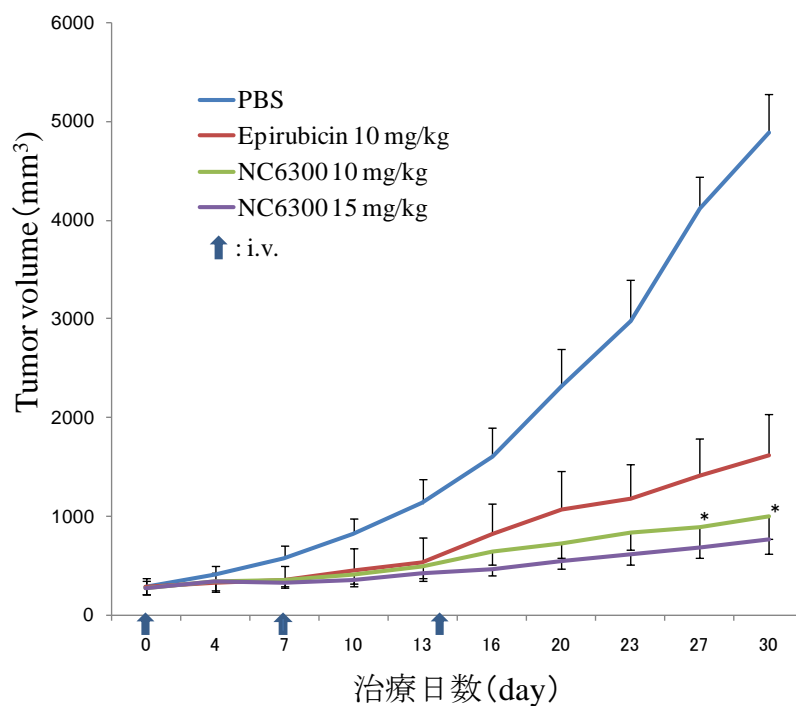


図 3-7. 腫瘍体積の変化

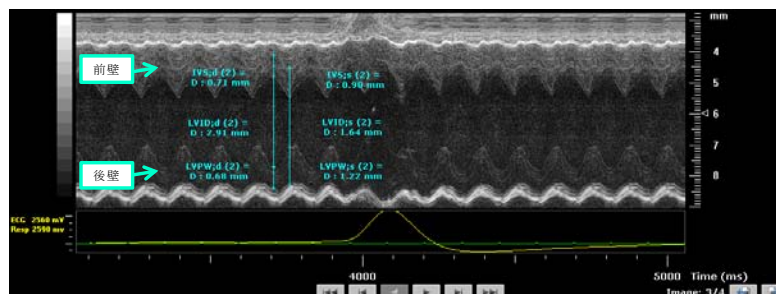
ES-2 細胞株  $3 \times 10^6$  cells/100  $\mu$ l を皮下移植した皮下腫瘍マウスモデルに、NC6300 10 mg/kg/300 $\mu$ l, 15 mg/kg/300 $\mu$ l, Epirubicin 10 mg/kg/300 $\mu$ l, PBS 300 $\mu$ l を Day 0, 7, 14 で i.v. にて投与した。腫瘍体積は週 2 回測定した。

\*;  $p < 0.05$  (mean  $\pm$  SD ; vs Epirubicin 10 mg/kg, Student's *t*-test,  $n=5$ )

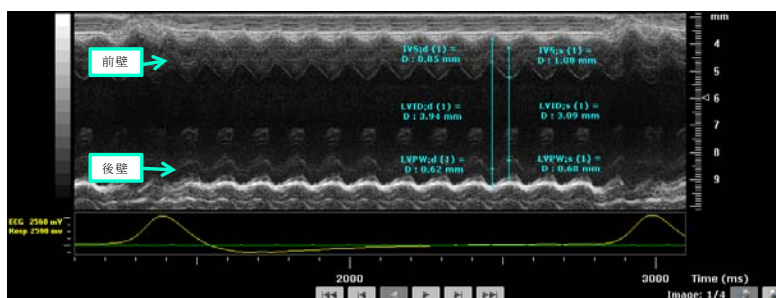
### 3-5. NC6300 による心機能への影響

5 週齢 雌 C57BL マウスを使用し、Epirubicin 投与群, NC6300 投与群, Doxorubicin 投与群, 及び PBS 投与群の心毒性評価を心エコーにて行った。心エコーの結果より、強い心毒性を示すことが知られている Doxorubicin 群は PBS 群と比較して後壁が薄くなり、拡張期末径を収縮期末径の差が小さくなっていた。また同様に、Epirubicin 群は NC6300 群と比較して後壁が薄くなり、拡張期末径と収縮期末径の差が小さくなっていた (図 3-8.)。

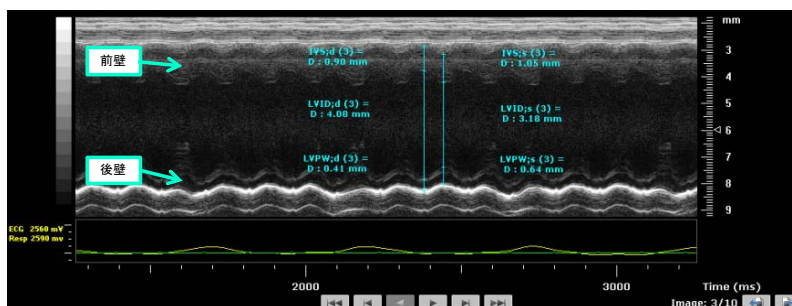
### PBS投与群



### Doxorubicin投与群



### Epirubicin投与群



### NC6300投与群

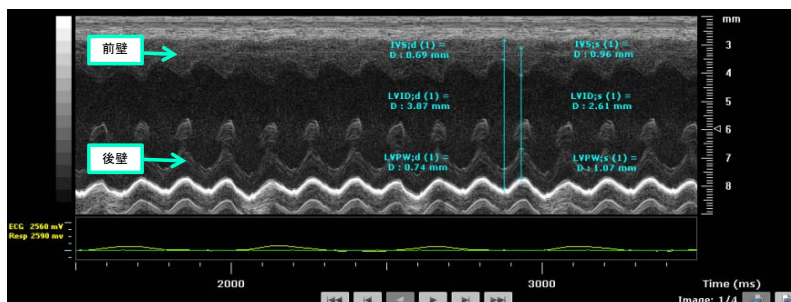


図 3-8. 各薬剤投与群における心エコー画像 (M-mode)

5 週齢 C57BL マウスを使用し、Epirubicin 10 mg/kg, NC6300 10 mg/kg, Doxorubicin 5 mg/kg、及び PBS を週 1 回 i.v. にて投与し、心エコー測定を行った。乳頭筋レベルで切断した M-mode 画像で左心拡張末期径と左心収縮末期径を測定した。上の画像は投与開始から 11 週目で薬剤を 9 回投与後に測定したものである。

また測定した左心拡張末期径と左心収縮末期径をもとに EF, FS 値を算出し、グラフ化した (図 3-9. 3-10.)。その結果、PBS 投与群と比べて NC6300 群, Epirubicin 群, Doxorubicin 群は有意に EF, FS 値が減少していた ( $P < 0.05$ )。しかし、NC6300 群と Epirubicin 群を比較すると、NC6300 群は Epirubicin 群と比べて EF, FS 値の減少が小さく、心筋収縮能が保持されていた。

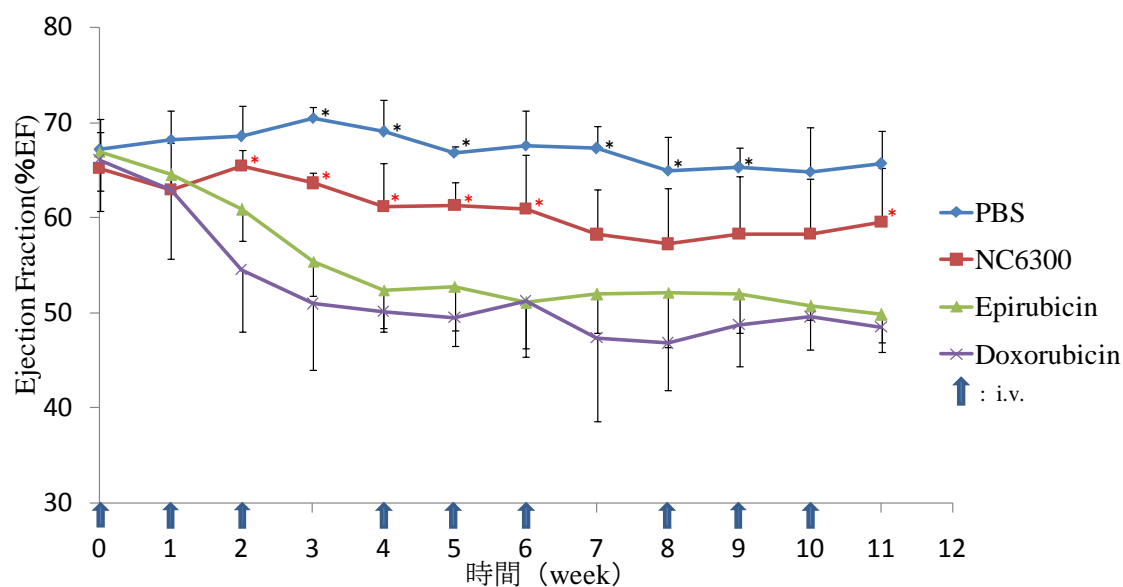


図 3-9. 左心室収縮能評価

5 週齢 C57BL マウスを用いて Epirubicin 10 mg/kg, NC6300 10 mg/kg, Doxorubicin 5 mg/kg、及び PBS を i.v. にて投与し、心エコー測定を行った。乳頭筋レベルで切断した M-mode 画像にて左心拡張末期径と左心収縮末期径を測定した。測定値をもとに左室駆出率を算出し、心筋収縮能を評価した。週 1 回投与を 3 週連続で行い 1 週間の休薬期間を設けた。薬剤投与後 11 週まで測定を行い、計 9 回投与した。

\*;  $p < 0.05$  (mean  $\pm$  SD ; vs NC6300, Student's *t*-test), \*;  $p < 0.05$  (mean  $\pm$  SD ; vs Epirubicin, Student's *t*-test),  $n=5$

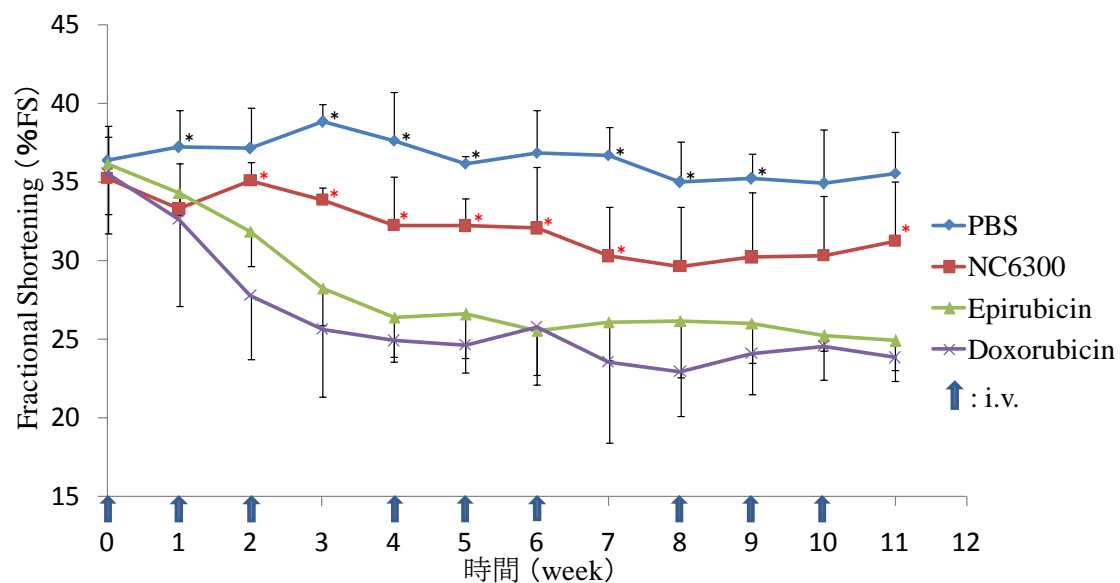


図 3-10. 左室内径短絡率評価

5 週齢 C57BL マウスを用いて Epirubicin 10 mg/kg, NC6300 10 mg/kg, Doxorubicin 5 mg/kg、及び PBS を i.v. にて投与し、心エコー測定を行った。乳頭筋レベルで切断した M-mode 画像にて左心拡張末期径と左心収縮末期径を測定した。測定値をもとに左室内径短絡率を算出し、心筋収縮能を評価した。週 1 回投与を 3 週連続で行い 1 週間の休薬期間を設けた。薬剤投与後 11 週まで測定を行い、計 9 回投与した。

\*;  $p < 0.05$  (mean  $\pm$  SD ; vs NC6300, Student's  $t$ -test), \*;  $p < 0.05$  (mean  $\pm$  SD ; vs Epirubicin, Student's  $t$ -test),  $n=5$

## 第4章 考察・結論・今後の展望



#### 4-1. pH 応答性 micelle 製剤について

pH 応答性 Epirubicin 内包 micelle 製剤 NC6300 は、ナノキャリア株式会社が開発した micelle 化ナノ粒子製剤であり、生体内の pH 変化に応答して Epirubicin を効果的に放出する性質を有する[19]。すなわち NC6300 の抗腫瘍効果を発揮する為には体内の pH 変化に反応して Epirubicin を放出する必要がある。この基本的な物性評価を行う為に、pH 変化に対する内包 Epirubicin の リリース能変化について調べた。その結果、実験開始後24時間での Epirubicin release 率は、pH 7.4 では20%、pH 4.8 では78%、pH 3.0 では 98%となった。この結果より NC6300 が pH 応答性 micelle 製剤の性質を有することが確認された。pH 7.4 の中性付近では pH とは無関係に、micelle の時間依存的分解によりリリースされることが考えられる。これより NC6300 を体内に投与した際には血中 pH である 7.4 付近では長時間安定で、細胞内のリソソーム (pH 4.8 付近) 中で内包されている Epirubicin がリリース可能であることが示唆された。従って、血中では Epirubicin が micelle からリリースされずに高分子の状態で維持されることで NC6300 の血中滞留性は高くなり、より EPR 効果を受けやすくなることで腫瘍組織への集積が高まることが期待できる。さらに細胞に入ってから Epirubicin がリリースされる為、がん組織に集積した Epirubicin が血中に拡散する可能性も小さく、より副作用が少なくがん細胞選択的に効果を示す可能性が示唆された。

NC6300 は、エンドソームと呼ばれる細胞膜が陥没した小胞を介して細胞内に取り込まれる[29]。今回の実験で NC6300 が pH に応答して Epirubicin を放出する micelle であることが示された。また *in vitro* での殺細胞効果を測定した結果、NC6300 をがん細胞に長時間接触させる程殺細胞効果が上昇した。このことより、時間依存的に NC6300 から放出される Epirubicin の量が増加したと考えられる。

しかし、その一方で pH が 7.4 の中性付近でも、時間依存的に多少リリースされることが示された。その為、実際に細胞内に入るまで Epirubicin は micelle と結合されており、細胞内での pH 環境の変化に反応して Epirubicin を放出したとは言い切れない。細胞外で時間依存的に結合が切れて Epirubicin が遊離し、濃度勾配により細胞内へと入り抗腫瘍効果を示した可能性もある。今後の課題として、実際に細胞内にて Epirubicin を放出しているかどうかを検証することが必要である。その為の実験方法のひとつとして、蛍光顕微鏡による Epirubicin の挙動の観察が挙げられる。Epirubicin は自家蛍光を発する為、蛍光顕微鏡にて挙動を確認することが可能である。経時的に挙動を観察し、かつ細胞質、リソソーム、核内の薬剤量を HPLC にて測定すれば、細胞内の pH に応答して Epirubicin を放出しているかを検証できると考える。

#### 4-2. 抗がん作用について

まず各薬剤の培養細胞を用いた殺細胞効果を検討する為に  $IC_{50}$  値を測定した。細胞株により  $IC_{50}$  の値は異なるが、Epirubicin は実際に臨床応用されている Taxol, Doxorubicin, Carboplatin と比較して遜色なく、抗がん剤として十分な殺細胞効果を示した。このことより、Epirubicin を内包している NC6300 は、抗がん剤として十分な殺細胞効果を発揮できる製剤であるといえる。また今回の研究では *in vivo* の実験で1種類の細胞株のみを扱い他の卵巣がん細胞株について言及しなかったが、*in vitro* での Epirubicin に対する殺細胞効果はどの細胞株も同程度の効果を示していた。このことより、他の細胞株を移植して作製した皮下腫瘍でも十分に効果は期待できると考えられる。よって、他の卵巣がん細胞株を移植した皮下腫瘍でも治療実験を行うことで、特定の細胞株に依存的な効果ではないことを示すことが可能であり、卵巣がんに対する NC6300 の有効性をより強く証明することができる。

*In vivo* での治療実験では Epirubicin と NC6300 の抗腫瘍効果を比較検討した。その結果、NC6300 は Epirubicin よりも優れた治療効果を示した。この結果から、Epirubicin に対する NC6300 の有効性を示すことができた。今後 pH 応答性のない他の micelle 製剤との抗腫瘍効果や副作用の程度の比較実験を行うことで、細胞内環境に反応する pH 応答性 micelle 製剤 NC6300 の有用性がより示せるのではないかと考える。

*in vitro* での培養細胞に対する殺細胞効果と *in vivo* でのマウスを用いた抗腫瘍効果を比較すると、NC6300 の効果に歴然とした差がある。Epirubicin と NC6300 の培養細胞に対する殺細胞効果を比較すると、薬剤投与後 24 時間で 42 倍、72 時間で 6 倍、120 時間で 5 倍 Epirubicin の殺細胞効果は NC6300 よりも優れていた。それにも関わらず *In vivo* では NC6300 の方が有意に抗腫瘍効果を示した。同じく DDS 製剤であるリポソーム製剤の Doxil においても同様な結果が得られている[30]。

この原因として、殺細胞効果発揮までのプロセスの違いにより *in vitro* での  $IC_{50}$  値に差が生じ、DDS 製剤は EPR 効果の恩恵を受けることで *in vivo* での抗腫瘍効果に違いが生じたと考えられる。低分子抗がん剤とは異なり、micelle 製剤は、内包抗がん剤と重合体との結合が切れて初めて抗がん作用を発揮する。このようなメカニズムの違いにより、抗がん作用を発揮する Epirubicin の濃度や、抗がん作用を発揮するまでの時間に違いが生じる。それが  $IC_{50}$  値の差の原因ではないかと考えられる。また、培養細胞条件下では Epirubicin と NC6300 は同一環境で同濃度となるが、生体内では EPR 効果により NC6300 はがん組織により多く集積する。その結果、投与した薬剤濃度は等しくても、がん組織に到達して抗腫瘍効果を発揮する濃度は NC6300 の方が高くなり、抗腫瘍効果の向上につながったと考えられる。実際薬物動態実験では、正常臓器では投与後 48 時間まで Epirubicin 群が高値を示すのに対して、腫瘍組織では投与後 12 時間で NC6300 群の Epirubicin 濃度が

Epirubicin 群を上回った。また、腫瘍組織における NC6300 群の AUC は Epirubicin 群よりも約 9 倍高値を示した。投与後 168 時間では臓器において両群共に Epirubicin 濃度は検出されなかったのに対して、腫瘍組織では NC6300 群のみ Epirubicin 濃度が検出された。これは前述した EPR 効果が顕著に現れた結果であると言える。

以上より、*in vitro* の培養条件下においてはどんなに殺細胞効果が強い薬剤であっても、生体に投与すると必ずしも十分な効果が得られるとは限らない。臨床で人体に高い効果を発揮する薬剤を作成するためには薬剤デリバリーや生体内環境を考慮に入れた薬の開発が必要不可欠である。

#### 4-3. 毒性について

本研究で使用しているナノ粒子 NC6300 の表面は、Polyethylene glycol (PEG) により形成されている。粒子表面に PEG 修飾を施すことで、水溶液中で水和させることが可能となり、粒子同士が必要以上に凝集することを防いでいる。また、PEG 修飾によるステルス効果により肝などの網内系への取り込みを抑制し、毒性を抑える働きも知られている[31-34]。

アントラサイクリン系抗がん剤の特徴的な毒性として心毒性が挙げられる。アントラサイクリン系抗がん剤の総投与量が  $900\text{mg/m}^2$  (体表面積) を超えると、うっ血性心不全を起こす可能性が高くなる[35]。心毒性の発生機序に関しては完全には解明されていないが、鉄-アントラサイクリン複合体などによって生じるフリーラジカルからもたらされる酸化ストレスが関与していると考えられている[21]。本研究では長期的心毒性を測定する為に、休薬期間を設けて薬剤を 9 回投与し、非侵襲的に測定できる心エコーを用いた。その結果、NC6300 群は Epirubicin 群よりも心筋収縮力が有意に保持され、NC6300 群は心臓への悪影響を軽減させることができた。また Epirubicin 群は NC6300 群と比較して心臓後壁が薄くなり、拡張期末径と収縮期末径の差が縮小した。このことより、Epirubicin 群では心筋が疲薄化し、薬剤によって心毒性が現れたと考えられる。これは両者の薬物動態の違いに起因することが考えられる。すなわち、micelle 製剤である NC6300 は EPR 効果よりがん組織に集積しやすい性質を持つ。一方で正常組織への集積が少なくなる。実際に薬物動態を測定し AUC を算出すると、NC6300 群における心臓の AUC は Epirubicin の 0.5 倍となった。その結果、副作用である心毒性が軽減できたのではないかと考えた。アントラサイクリン系抗がん剤は一定量を超えると不可逆的心毒性が生じる可能性がある為、使用量が制限されている。しかしながら心臓への副作用が軽減されれば、使用量の規制を緩和することができる。これは臨床応用された時に多大なメリットとなるのではないかと考える。奏功している薬剤が毒性の為に使えなくなることは、患者にとって大きな不利益となる。

腫瘍組織及び正常組織中の薬物動態を調べる為に、Epirubicin 投与群、NC6300 投与群の各々の組織中薬剤濃度を測定した。薬剤投与直後では、Epirubicin 群はすべての組織において NC6300 群の Epirubicin よりも高値を示した。これは、Epirubicin は低分子抗がん剤である為、血中から組織への移行性が高いことが原因として挙げられる。この急激な薬剤濃度の上昇が治療域を超えて毒性域に達し、副作用を起こす一因と考えられる。NC6300 は組織内の薬剤濃度の急激な上昇を避けることができる。かつ EPR 効果により正常組織への分布を抑えられる為、心毒性以外の毒性の観点においても NC6300 の有用性が期待できる。

#### 4-4. 今後の展望

近年新薬の多くが米国で先に上市される傾向にあり、新薬が普及するスピードも速い。一方日本においては、ドラッグ・ラグが問題となっており、海外で承認されて数年経っても未だ上市されていない医薬品が多数存在するという現状である。しかしながら、日本の医療界の問題はそれだけではない。最近抗体医薬品が盛んに臨床開発されているが、それらはほとんどすべてが欧米企業由来である。このままでは海外の製薬企業が創出した新薬に頼り切りになってしまい、医療面において諸外国に遅れをとる一方である。やはり、日本独自の新薬を開発し、海外へと展開してゆくことも重要である。その為の道具として、micelle 製剤は有効ではないかと考える。

伝統的に日本の高分子化学が強いことも起因して DDS 製剤は日本独自のものが多く、日本で開発された DDS 製剤の例としてリポ PGE1 (プロスタグランディン E1 の脂肪微粒子製剤) やリ्यूプリン (黄体形成ホルモン放出ホルモン徐放性注射剤) はすでに臨床応用されている[36]。

現在 pH 応答性 micelle 製剤のみならず、抗体結合 micelle[37]や温度感受性 micelle [17]など様々な製剤が開発されており、米国では多くの micelle 製剤の臨床試験が進められている。しかしながら、前臨床試験では腫瘍を消失させ根治に導いた薬剤であっても臨床試験では無効なケースもあり、臨床応用の道のりはなかなか険しく容易ではない。科学の発展に伴い今後ますます製剤の多様化は進むであろう。その中で良好な成績を修め、臨床応用されてがん患者の苦しみを少しでも救える薬剤が創出されることを願う。リポ PGE1 やリ्यूプリンに続いて日本から新薬を海外へ発信する為にも、DDS 研究のさらなる発展に貢献したい。

## 参考文献

1. 国立がん研究センターがん対策情報センター (1980年から1997年までの症例の2000年4月までの治療結果、1958年から2008年までの人口動態統計によるがん死亡データ)
2. Salazar-Martinez, E., et al., Reproductive factors of ovarian and endometrial cancer risk in a high fertility population in Mexico. *Cancer Res*, 1999. 59(15): p. 3658-62.
3. Rossing, M.A., et al., Ovarian tumors in a cohort of infertile women. *N Engl J Med*, 1994. 331(12): p. 771-6.
4. FIGO (International Federation of Gynecology and Obstetrics) annual report on the results of treatment in gynecological cancer. *Int J Gynaecol Obstet*, 2003. 83 Suppl 1: p. ix-xxii, 1-229.
5. 日本婦人科腫瘍学会, 卵巣がん治療ガイドライン. 2007年.
6. Tavassoli FA, D.P., Pathology and genetics. Tumours of the Breast and Female Genital Organs. World Health Organization Classification of Tumors. IARC Press, Lyon 2003.
7. 神崎秀陽, 看護のための最新医学講座 婦人科疾患. 中山書店, 2001年.
8. 日本産科婦人科学会・日本病理学会編, 卵巣腫瘍取り扱い規約 第1部. 金原出版, 1990.
9. Nakashima, N., et al., Study of ovarian tumors treated at Nagoya University Hospital, 1965-1988. *Gynecol Oncol*, 1990. 37(1): p. 103-11.
10. Makar, A.P., et al., The prognostic significance of residual disease, FIGO substage, tumor histology, and grade in patients with FIGO stage III ovarian cancer. *Gynecol Oncol*, 1995. 56(2): p. 175-80.
11. Brugghe, J., et al., Further evaluation of reproducibility and prognostic value of histologic typing and grading in FIGO stage I ovarian cancer patients without systemic locoregional adjuvant treatment. *Int J Gynecol Cancer*, 1995. 5(4): p. 262-268.
12. Conway, C., et al., Simple cyst in the postmenopausal patient: detection and management. *J Ultrasound Med*, 1998. 17(6): p. 369-72; quiz 373-4.
13. Ovarian Cancer Guideline (Version 2007). National Comprehensive Cancer Network. [http://www.nccn.org/professionals/physician\\_gls/PDF/ovarian.pdf](http://www.nccn.org/professionals/physician_gls/PDF/ovarian.pdf).
14. 日本産科婦人科学会, 卵巣腫瘍取り扱い規約 第2部. 金原出版, 1997年.
15. Sugiyama, T., et al., Clinical characteristics of clear cell carcinoma of the ovary: a distinct histologic type with poor prognosis and resistance to platinum-based chemotherapy. *Cancer*, 2000. 88(11): p. 2584-9.
16. Matsumura, Y. and H. Maeda, A new concept for macromolecular therapeutics in cancer chemotherapy: mechanism of tumoritropic accumulation of proteins and the antitumor agent smancs. *Cancer Res*, 1986. 46(12 Pt 1): p. 6387-92.
17. Zhao, A., et al., Thermosensitive micelles from PEG-based ether-anhydride triblock copolymers. *Pharm Res*. 27(8): p. 1627-43.
18. Maeda, N., et al., Anti-neovascular therapy by use of tumor neovasculture-targeted

- long-circulating liposome. *J Control Release*, 2004. 100(1): p. 41-52.
19. Harada, M., et al., Improved anti-tumor activity of stabilized anthracycline polymeric micelle formulation, NC-6300. *Cancer Sci*. 102(1): p. 192-9.
  20. Arcamone, F., et al., Adriamycin, 14-hydroxydaunomycin, a new antitumor antibiotic from *S. peuceitius* var. *caesius*. *Biotechnol Bioeng*, 1969. 11(6): p. 1101-10.
  21. *CANCER principles & Practice of oncology*.
  22. Cersosimo, R.J. and W.K. Hong, Epirubicin: a review of the pharmacology, clinical activity, and adverse effects of an adriamycin analogue. *J Clin Oncol*, 1986. 4(3): p. 425-39.
  23. American Type Culture Collection.
  24. Whitaker, G., et al., CE-LIF method for the separation of anthracyclines: application to protein binding analysis in plasma using ultrafiltration. *J Sep Sci*, 2008. 31(10): p. 1828-33.
  25. Zucker, S., J. Cao, and W.T. Chen, Critical appraisal of the use of matrix metalloproteinase inhibitors in cancer treatment. *Oncogene*, 2000. 19(56): p. 6642-50.
  26. Helbock, H.J., et al., DNA oxidation matters: the HPLC-electrochemical detection assay of 8-oxo-deoxyguanosine and 8-oxo-guanine. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1998. 95(1): p. 288-93.
  27. Nozaki, N., et al., Modulation of doxorubicin-induced cardiac dysfunction in toll-like receptor-2-knockout mice. *Circulation*, 2004. 110(18): p. 2869-74.
  28. *Jpn J Ultrasonics* Vol. 32 No.3 (2005)
  29. Lescar, J., et al., The Fusion glycoprotein shell of Semliki Forest virus: an icosahedral assembly primed for fusogenic activation at endosomal pH. *Cell*, 2001. 105(1): p. 137-48.
  30. Lyass, O., et al., Correlation of toxicity with pharmacokinetics of pegylated liposomal doxorubicin (Doxil) in metastatic breast carcinoma. *Cancer*, 2000. 89(5): p. 1037-47.
  31. Junutula, J.R., et al., Site-specific conjugation of a cytotoxic drug to an antibody improves the therapeutic index. *Nat Biotechnol*, 2008. 26(8): p. 925-32.
  32. Mastrobattista, E., et al., Targeted liposomes for delivery of protein-based drugs into the cytoplasm of tumor cells. *J Liposome Res*, 2002. 12(1-2): p. 57-65.
  33. Moghimi, S.M., The effect of methoxy-PEG chain length and molecular architecture on lymph node targeting of immuno-PEG liposomes. *Biomaterials*, 2006. 27(1): p. 136-44.
  34. Matsumura, Y., et al., Phase I and pharmacokinetic study of MCC-465, a doxorubicin (DXR) encapsulated in PEG immunoliposome, in patients with metastatic stomach cancer. *Ann Oncol*, 2004. 15(3): p. 517-25.
  35. Ryberg, M., et al., Epirubicin cardiotoxicity: an analysis of 469 patients with metastatic breast cancer. *J Clin Oncol*, 1998. 16(11): p. 3502-8.
  36. Drug Delivery System 18-5, September 2003. 日本 DDS 学会.
  37. Torchilin, V.P., Targeted polymeric micelles for delivery of poorly soluble drugs. *Cell Mol Life Sci*, 2004. 61(19-20): p. 2549-59.

## 謝辞

本研究の機会を与えて頂きました国立がんセンター東病院臨床開発センターがん治療開発部部長 兼 東京大学大学院新領域創成科学研究科先端生命科学専攻がん先端生命科学分野指導教員の松村保広先生に心から感謝申し上げます。また、がん治療開発部の安永正浩先生、黒田順一郎先生、古賀宣勝先生、高橋遍先生、大橋建也さん、小池浩代さん、瀧ヶ平美里さん、本田玲子さんには研究以外にも多くのことをご指導して頂きました。至らない点が多々あったにも関わらず時間を割いて教えて頂き、心より感謝申し上げます。また秘書である椎名薫さん、嶋田真美子さん、進藤博子さんには生活面においても支えて頂き、お礼申し上げます。

本研究で用いた pH 応答性 Epirubicin 内包 micelle 製剤 NC6300 を提供して下さったナノキャリア株式会社に感謝申し上げます。

同研究科の稲塚歩佳さん、小野塚博子さん、齋藤洋平さん、藤澤優さん、星野歩子さん、須藤夏希さん、千葉政子さん、松島洸達君、鈴木牧人君、天野芳隆君、伊藤傑君、佐藤隆太君にも心から感謝しております。皆さんがいたからこそ大学院での研究生活が有意義で楽しいものとなりました。そして、研究室の同期である久田洋平君、中村彰吾君とは共に多くの時間を過ごし、私を支えてくれました。ありがとうございました。

最後になりましたが、常に私を支えてくれた家族にも心から感謝の意を表して謝辞と致します。